

Universidad Autónoma de Madrid  
Departamento de Bioquímica



**Regulación de la vía de Akt y mTORC1 por  
Cot/tpl-2 en macrófagos activados por LPS:  
implicaciones en la expresión de  
mediadores inflamatorios**

Marta López Peláez

Madrid, 2012



Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid



**Regulación de la vía de Akt y mTORC1 por Cot/tpl-2 en  
macrófagos activados por LPS: implicaciones en la  
expresión de mediadores inflamatorios**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:

**Marta López Peláez**

Licenciada en Bioquímica, para optar al grado de Doctor  
por la Universidad Autónoma de Madrid

Directoras de tesis:

**Dra. Susana Alemany de la Peña**

Investigadora Científica

**Dra. Margarita Fernández Martín**

Profesora Titular

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"

CSIC-UAM







MINISTERIO  
DE ECONOMÍA  
Y COMPETITIVIDAD



Dra. Susana Alemany de la Peña, Investigadora Científica del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM, y Dra. Margarita Fernández Martín, Profesora Titular de la Universidad Autónoma de Madrid, certificamos que:

Marta López Peláez, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado: **“Regulación de la vía de Akt y mTORC1 por Cot/tpl-2 en macrófagos activados por LPS: implicaciones en la expresión de mediadores inflamatorios”** en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”.

Consideramos que el mencionado trabajo es satisfactorio y apto para poder optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a todos los efectos, firmamos el presente certificado en Madrid, a 26 de Marzo de 2012.

Fdo.: Susana Alemany de la Peña  
Directora de la Tesis  
Investigadora Científica, CSIC

Fdo.: Margarita Fernández Martín  
Directora de la Tesis  
Profesora Titular, UAM

VºBº Tutora  
Margarita Cervera Jover  
Catedrática, UAM



Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (UAM-CSIC), gracias a una Ayuda a la Investigación para Personal Investigador en Formación de la UAM.



***A mis padres***

***A mi hermana***

***A Alberto***



*"La verdadera sabiduría está en reconocer la propia ignorancia"*

Sócrates





## **AGRADECIMIENTOS**



Parece mentira que hayan pasado casi seis años desde la primera vez que pisé el IIB y que haya llegado ya el momento de escribir los agradecimientos. Me han salido muchas canas y achaques desde entonces, pero también he vivido muchas experiencias inolvidables gracias a toda la gente con la que he convivido durante esta etapa de mi vida. ¡Espero no olvidarme de ninguna!

En primer lugar, quiero agradecer a mi Directora de Tesis, la Doctora Susana Alemany, por darme primero la oportunidad de hacer la Avanzada en su laboratorio y por confiar en mí después para hacer la Tesis Doctoral. No siempre las cosas fueron fáciles, pero siempre has sabido dirigirme para resolver todos los problemas que nos hemos encontrado por el camino. Gracias por tu constancia, tu dedicación y tu trabajo, y por ayudarme además con mi nueva etapa post-doctoral. También tengo que agradecer a mi co-directora, la Doctora Margarita Fernández, por estar siempre dispuesta a ayudar en todo lo posible, por su paciencia y por su pasión por la enseñanza. Al Doctor Lisardo Boscá, por ayudarnos a encaminar nuestros experimentos. Y a la Doctora Susana Guerra, por enseñarme tantas cosas nuevas en la última etapa de mi doctorado.

Y por supuesto gracias a las niñas y niños del B-15. A Pili y a Cristina, por ayudarme cuando empecé y no tenía ni idea de nada y por aguantar tener que terminarme los experimentos cuando me tenía que ir corriendo a clase. Gracias también a todos los técnicos que han pasado por el labo y que tanto nos han ayudado, a Cristina, a Vero, a Lourdes, y muy especialmente a Roberto y a Raquel, sin vuestras manos aún no estaría aquí. A Roberto, por ser una persona tan trabajadora y además siempre con una sonrisa en la boca. A Raquel, por ser tan eficaz y rápida, es increíble, ¡qué energía! Gracias a los estudiantes, Noelia, Zulema y Gemma. Zulema, fue una pena que no pudieses quedarte al final. Gemmita, qué suerte que te quedases cerquita nuestro. Tampoco me olvido de las nuevas generaciones, Clara y Álvaro, os deseo mucha suerte a los dos. Y por supuesto a mis compis y amigos. A Irene, que entró a la vez que yo y que ha sido una compañera estupenda, gracias por los momentos tan divertidos que me has hecho pasar y por ser tan fácil trabajar contigo. Seguro que te va todo fenomenal en la vida. A Carlos, con el que tuvimos que quitar el cartel de “las niñas del B-15”, me alegro de que al final vayas a poder estar en mi tesis porque no sería lo mismo sin ti. Muchas gracias por la contra reloj del último mes, y ¡ánimo!

A los chic@s de Víctor. Por tantos buenos momentos en los pinos, las bodas, las cenas, las salidas nocturnas... A “Kitina” por invitarnos a disfrutar de unas tapitas por Alcalá. A Alaitz, por la gran fiesta de los 80. A Edel, por hacernos creer que todos los viernes salía de fiesta cuando en realidad se quedaba en casa viendo la tele. A los que junto con mi labo, habéis sido como mi segunda familia durante estos años. A María P, por cuidarnos y por compartir mis frikadas con las líneas temporales y los universos paralelos. Recuerda que la integridad mental de este grupo depende de ti. A Pepe, por enseñarme que toda longaniza tiene dos principios y dos finales, por haber vivido una guerra, por esos chistes “tan buenos”, y por decirnos “pasarlos bien” a las nueve de la noche en la biblioteca. A María V, que ha vivido conmigo los últimos momentos de tesis en la biblio, por nuestros paseos por los pasillos como zombis, nuestros diálogos surrealistas en el baño, por usar mi moño de micrófono y por aguantar mis constantes dudas con los tiempos verbales y con el Illustrator. Para cuando yo esté entregando,

¡tú ya serás Doctora! También, a la veterana María Galardi, por tu vitalidad y alegría. Estoy convencida de que el día que te vayas el IIB se derrumba, y ahora, ¡a por todas! Será muy difícil encontrar unos compañeros como vosotros.

También a mis vecinos del pasillo, con los que he compartido tantos momentos en las largas horas de células, risas en las barbacoas de la facultad, etc. Al B-13, por nuestras comidas de Navidad en el chino tapadera. A Madalina, ¡venga que ya te queda poco! Por supuesto a todo el B-11, por habernos ayudado siempre desde que llegasteis y por aguantarnos tanto. Gracias Patri, Paqui y Rafa por haber tenido tanta paciencia, ¡espero que os vaya fenomenal!

Gracias a todos los del IIB que siempre intentáis hacer piña y fomentar el compañerismo en el centro. A Isa y a Natalia, por organizar los concursos de pintxos. A Merche, Toño y Laura por no perderse ni una. A Jose, Diana y Marina por estar siempre dispuestos a bailar un “single ladies”. A María, Dani, Bárbara y Leti que ya no estáis, pero siempre fuisteis un clásico en las jornadas y en los concursos de disfraces de carnaval. A las “Peronas” María, Vanne y Vero, por el viaje tan divertido a Noruega. A Laura, por compartir con nosotros el pádel y sobre todo las cañitas postpadel. A Dani, por hacer mucho más entretenidos los momentos de biblio y por ser tan maruja y contarnos todo lo que se cuece en el IIB.

No me olvido de la gente de servicios. A Laura de citometría, por tener tanto interés en nuestros experimentos, eres una currante. A Toño y a Guti de informática, por resolver los momentos de pánico con los troyanos. A Javi y a Antonio de imagen, gracias Javi por ayudarme para que todo me quedase bonito. A Carlos y Diego de seguridad, por aguantar mis idas de olla durante la escritura. A Fernando, Ruth e Ili del animalario, por habernos enseñado y ayudado tanto. A Aída, por cuidarnos.

A toda la gente con la que compartí tres maravillosos meses en Cincinnati. Gracias a George Thomas y a Sara Kozma por darme la oportunidad de hacer una estancia en su laboratorio. Gracias Sara porque además de ayudarme en todo, eres una excelente cocinera y anfitriona. Gracias George por intentar practicar tu español siempre conmigo y contarme aventuras divertidas de mi jefa. A sus hijas, por hacer tan agradables las veladas en su casa frente a la chimenea. Por supuesto a todos mis compañeros. A Amanda, por ser la secretaria más tenaz que he visto nunca. A Melinda y Melissa, por estar siempre pendientes de mí para que todo fuese bien. Al cowboy Adem, mi compañero de oficina con el que siempre se podían tener conversaciones transcendentales. A Giulio y a Valentina, por ser una pareja encantadora. A Annand, por hacer de chofer, por ayudarme a instalarme y por explicarme cómo funcionan las cosas en Estados Unidos. Sin ti me hubiese sentido perdida en mitad de Ohio. A Stefano, porque a pesar de que estabas hasta arriba de trabajo preparando todo para irte a París, me dirigiste y me ayudaste en todo para sacar mi proyecto adelante en tan poco tiempo. ¡Al final pudimos abrir el cava! Seguro que te va todo fenomenal en tu nueva etapa como jefe. A mi compi de piso Ruth G, por tener siempre aventuras surrealistas que contar y por hacerme sentir como en mi propia casa. Recuerda que me debes una cena. A los que me acogieron como si fuese de su familia, como “la prima”. A Dani y a Nestor, por enseñarme a bailar. A Manuel por regalarme sus poesías para cuando se haga famoso. A Nazanin, por ser la única persona que sólo sabe hablar español cuando bebe tequila. A Mafe, por ser tan divertida. A Carlitos, por sus juegos

de palabras. A Miguel, por cuidarme y asegurarse de que llegaba bien siempre a casa. A Dinesh, por dejarme dormir en su casa tras las largas noches. Y a Ruth M, por ayudarme desde incluso antes de ir a *"Cincinasty"*, por integrarme en sociedad nada más aterrizar y por hacer que fuese una experiencia increíble.

Gracias a mi grupo de amigos "consorte", porque siempre me habéis acogido como una más. A Nadia, por traernos potingues para cuidarnos. A Hugo, por los buenos momentos de interrail. A Ana V, por ser mi compi de buceo y la única que comprende mi amor por mi perra. A Ana Q, por ser tan ocurrente y entender mis momentos de crisis y enfados. A Alberto, por tener siempre un debate preparado para desconectar. A Javi, por estar hiperactivo y caer en coma en cuestión de segundos. Al Licenciado Don Kike Raso, por intentar hacerme pensar siempre en positivo.

A mis amigos de Universidad por todos los buenos momentos que pasamos durante la carrera que hicieron de esa etapa algo inolvidable, el viaje a Cuba, las fiestas de los jueves, las risas en la cafetería, etc. A Nacho, por juntarnos en sus conciertos. A Dani, por ser la única persona capaz de saber quién ha ganado una partida de petanca trazando bisectrices. A Tere, por ser una persona radiante y por las aventuras en Cádiz. A Celia, por los buenos ratos poniéndonos al día con un buen café en Tres Cantos. A Irene, mi compi no sólo de facultad, sino también del IIB y de biblio, ¡mucho ánimo! Al final todo tendrá su recompensa. Gracias a Cris y a ti por reunirnos siempre en Aranjuez. A Tefi, por perseguirme desde el Santa Joaquina de Vedruna, a Tres Cantos, al Instituto y finalmente a la Uni. Contigo siempre parece que no pasa el tiempo.

A mis amigas de siempre. A María y a Esther por conseguir que seamos amigas desde que teníamos chupete. A Crispu y a Begoña, por tantos momentos en el triramero y en Mallorca y por estar siempre dispuestas a hacer un hueco en la agenda. A mis niñas. A Sara, por haber sido mi vecina, mi compi y sobretodo mi amiga. Por hablar con las piedras y hacer que cada momento sea diferente. A Patri, por ser tan zen, tan mística y por ser nuestra psicóloga particular. Estoy segura de que lo conseguirás porque lo llevas dentro. Os admiro mucho a las dos. Gracias por los ánimos y sabios consejos de los últimos meses.

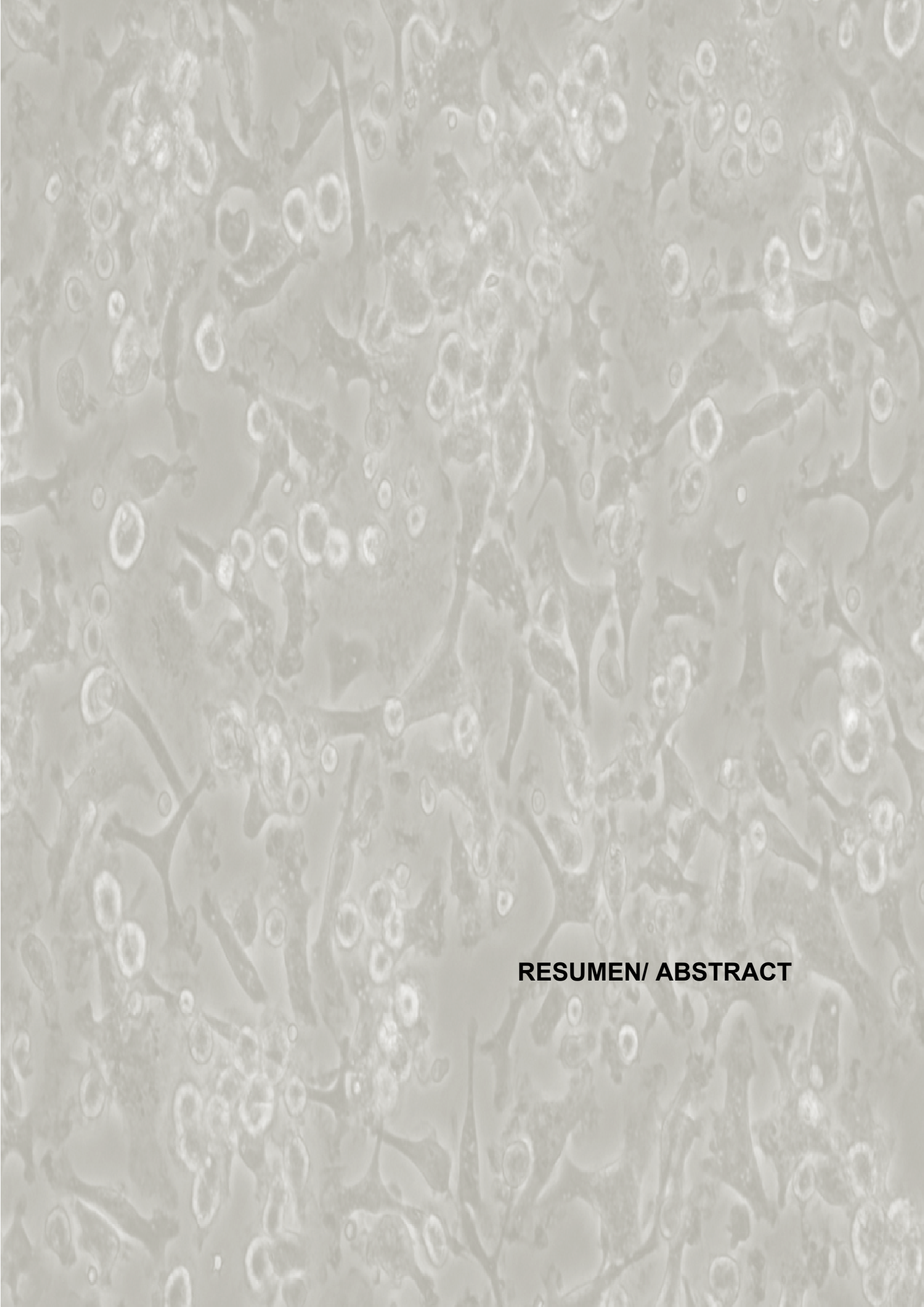
A mi familia, por estar siempre pendiente de nosotras y por su ayuda incondicional en todo momento.

A Mamá y a Alba. Gracias por vuestra fortaleza y por mantenernos más unidas que nunca en los momentos duros que la vida nos ha hecho pasar. Por apoyarme e intentar ayudarme siempre en todo lo posible aunque no entendáis nada de lo que hago, y por soportarme en esta última etapa. No os preocupéis, el tiempo pasa volando.

A Alberto, porque desde hace casi siete años has compartido mi vida, los buenos y malos momentos. Has sido mi andamio, sin ti no sé si hubiese podido llegar hasta aquí. Por haber sufrido otra segunda tesis conmigo, y por la nueva etapa de nuestra vida, porque seguro que juntos conseguiremos todo lo que nos propongamos.

A ti Papá, que tanto hiciste por mí. Ojalá estuvieses aquí.



The background of the page is a dense, grayscale microscopic image. It features numerous circular and oval structures, likely cells or microorganisms, with varying internal textures and some prominent nuclei. The overall appearance is that of a histological or cytological slide.

## **RESUMEN/ ABSTRACT**





La estimulación de los receptores tipo Toll (TLRs) por patrones moleculares de patógenos, como el LPS, induce la activación de las MAP quinasas y la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  iniciando la expresión de mediadores pro-inflamatorios. La mayoría de los TLRs activan a su vez la vía de señalización de PI3K-Akt-mTORC1 que regula negativamente la señalización pro-inflamatoria mediada por los TLRs, controlando así la magnitud adecuada de la respuesta inmune. Cot/tpl-2 es la única MAP quinasa quinasa que activa MKK1/2-Erk1/2 en respuesta a la estimulación de los TLRs. Nuestros experimentos demuestran que Cot/tpl-2-MKK1/2-Erk1/2 media la fosforilación de Akt en S473 y también de RSK, que regula la activación de mTORC1, en los macrófagos tras la estimulación de distintos TLRs. La capacidad de Cot/tpl-2 de modular la activación de Akt y mTORC1 es independiente del adaptador reclutado (MyD88 o TRIF) tras la estimulación de los distintos TLRs. En correlación con la inadecuada activación de Akt y mTORC1, los macrófagos Cot/tpl-2 KO presentan una fosforilación más sostenida en el tiempo de las MAP quinasas p38 $\alpha$  y JNK1/2, una menor re-síntesis de I $\kappa$ B $\alpha$  y una mayor expresión del mediador inflamatorio NOS2 en respuesta a la estimulación del TLR4 por LPS. La inhibición de la vía de señalización de PI3K elimina las diferencias de expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  y NOS2 entre los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO. Por otro lado, la activación de mTORC1 induce la fosforilación de 4E-BP1, lo que provoca su disociación de la proteína de unión a Cap eIF4E, siendo esta disociación el elemento clave en la iniciación de la traducción Cap-dependiente de mensajeros. La capacidad de Cot/tpl-2 de activar mTORC1 vía RSK induce la traducción Cap-dependiente, de forma que Cot/tpl-2 activa la incorporación de <sup>35</sup>S-metionina/cisteína en varias proteínas en respuesta a la estimulación de los macrófagos con LPS. Asimismo, Cot/tpl-2 induce el reclutamiento en ribosomas de los 5' TOP mRNAs eEF1 $\alpha$  y eEF2 y de los mensajeros de los mediadores inflamatorios TNF $\alpha$ , IL-6 y KC, activando su traducción. Además, Cot/tpl-2 también incrementa los niveles totales de mRNA de TNF $\alpha$ , IL-6 y KC, induciendo la estabilidad de estos mensajeros. Los macrófagos necesitan un control rápido y adecuado de la expresión de mediadores inflamatorios en respuesta a la infección por patógenos para llevar a cabo una correcta defensa del huésped sin inducir daño en el organismo. En esta Tesis Doctoral hemos demostrado un papel novedoso de Cot/tpl-2 en la activación de Akt y mTORC1 en respuesta a la activación de los TLRs, lo que permite que Cot/tpl-2 module la expresión de mediadores inflamatorios en los macrófagos a varios niveles, incluido el de la traducción Cap-dependiente de sus mRNAs, regulando la magnitud de respuesta inmune de estas células.



Stimulation of the Toll-like receptors (TLRs) by pathogen molecular patterns as LPS triggers the activation of the MAPKs and I $\kappa$ B $\alpha$  degradation, culminating in the production of pro-inflammatory mediators. Most TLRs also activate the PI3K-Akt-mTORC1 signaling pathway which negatively regulates the pro-inflammatory signals mediated by TLRs, and thereby controlling the accurate magnitude of the immune response. Cot/tpl-2 is the sole MAP kinase kinase kinase that activates MKK1/2-Erk1/2 in response to the stimulation of TLRs. Our data show that Cot/tpl-2-MKK1/2-Erk1/2 induces S473 Akt and RSK phosphorylation, which modulates mTORC1 activity in macrophages following LPS stimulation. The capacity of Cot/tpl-2 to control the activation state of Akt and mTORC1 is independent of the adapter recruited (MyD88 or TRIF) to the TLR, following its stimulation. In agreement with the decreased Akt and mTORC1 activation, Cot/tpl-2 KO macrophages show a more sustained MAP kinases p38 $\alpha$  and JNK1/2 phosphorylation, an impaired I $\kappa$ B $\alpha$  re-synthesis as well as an enhanced expression of the inflammatory mediator NOS2 in TLR4-stimulated macrophages by LPS. Accordingly, upon LPS stimulation, PI3K signaling pathway inhibition abolishes the differences in I $\kappa$ B $\alpha$  and NOS2 expression between Wt and Cot/tpl-2 KO macrophages. Besides, Cot/tpl-2 modulates the mTORC1 induced-phosphorylation of 4E-BP1, which triggers its dissociation from the Cap-binding protein eIF4E, the key event in the initiation of Cap-dependent translation. Thus, Cot/tpl-2 activates Cap-dependent translation. Consequently, Cot/tpl-2 increases <sup>35</sup>S-cysteine-methionine incorporation in several proteins in LPS-stimulated macrophages. Indeed, Cot/tpl-2 induces the ribosomal recruitment of the 5' TOP eEF1 $\alpha$  and eEF2 mRNAs as well as of TNF $\alpha$ , IL-6 and KC inflammatory mediators transcripts, activating their translation. Furthermore, Cot/tpl-2 also increases total TNF $\alpha$ , IL-6 and KC mRNA expression, by inducing the stability of these messengers, following LPS stimulation of macrophages. Macrophages require a rapid and adequate control of inflammatory mediators expression in response to pathogen infection to carry out a proper host defense without inducing host damage. In this Thesis, we have demonstrated a novel role of Cot/tpl-2 in the activation of Akt and mTORC1 which allows Cot/tpl-2 to modulate the expression of inflammatory mediators in macrophages at various levels, including mRNA translation, adjusting the magnitude of immune response of these cells.



The background of the entire page is a dense, monochromatic pattern of microscopic images, likely histological sections, showing various cellular structures and tissue morphology in shades of gray.

## ÍNDICE



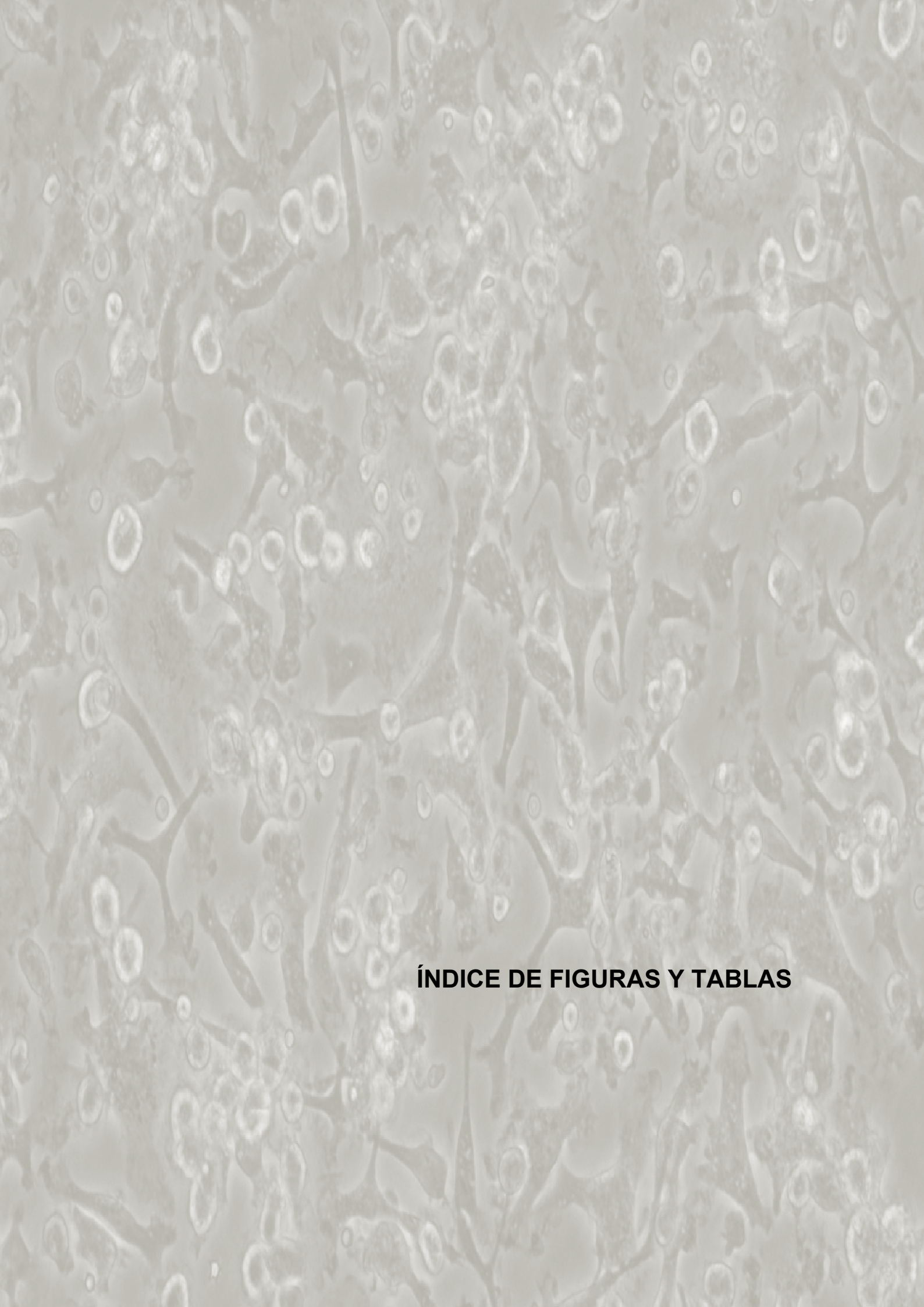
<b>Agradecimientos</b>	<b>XV</b>
<b>Resumen/ Abstract</b>	<b>XXI</b>
<b>Índice</b>	<b>3</b>
<b>Índice de figuras y tablas</b>	<b>9</b>
<b>Abreviaturas y acrónimos</b>	<b>15</b>
<b>Introducción</b>	<b>19</b>
1. El sistema inmune	19
1.1. El sistema inmune innato	19
1.2. El sistema inmune adaptativo	20
2. Los macrófagos en el sistema inmune	21
2.1. Activación clásica de los macrófagos o M1	22
2.2. Activación alternativa de los macrófagos o M2	23
2.3. Desactivación de los macrófagos	23
3. Los TLRs en el sistema inmune innato	25
3.1. Vía de señalización MyD88 dependiente	26
3.2. Vía de señalización MyD88 independiente	27
3.3. Inhibición de la señalización mediada por los TLRs	28
3.3.1. Inhibición temprana de la señalización por TLRs: PI3K	28
3.3.2. Inhibición tardía de la señalización por TLRs: SOCSs	28
4. Papel fisiológico de las MAP quinasas. Las MAP3K8 Cot/tpl-2	29
4.1. Descubrimiento de caracterización de Cot/tpl-2	30
4.2. Papel fisiológico de Cot/tpl-2	31
4.2.1. Activación de Cot/tpl-2 en respuesta a estímulos extracelulares	31
4.2.2. Señales intracelulares inducidas por Cot/tpl-2	32
4.2.3. Implicación de Cot/tpl-2 en la respuesta inmune e inflamación	32
4.3. Cot/tpl-2 como diana de drogas anti-inflamatorias	33

5. Regulación de la expresión de proteínas	33
5.1. Regulación de la estabilidad de mRNA	33
5.2. Regulación de la biosíntesis de proteínas	34
5.2.1. Iniciación de la traducción	34
• Regulación de la iniciación de la traducción Cap-dependiente	34
• Regulación de la iniciación de la traducción IRES-dependiente	35
5.2.2. Activación de la biosíntesis de proteínas Cap-dependiente en respuesta a estímulos extracelulares	35
• Activación y funciones fisiológicas de mTORC1	36
• Activación y funciones fisiológicas de mTORC2	38
5.3. Relevancia del control de la expresión de proteínas en el sistema inmune	38
<b>Objetivos</b>	<b>41</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>45</b>
1. Materiales	45
1.1. Anticuerpos	45
1.1.1. Anticuerpos primarios utilizados para Western blot	45
1.1.2. Anticuerpos secundarios utilizados para Western blot	45
1.1.3. Anticuerpos acoplados a fluoróforos para citometría de flujo	46
1.1.4. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia	46
1.2. Oligos utilizados para RT-PCR	46
1.2.1. Oligos Taqman	46
1.2.2. Oligos Sybr green	47
1.3. Cultivo celular	47
1.4. Estímulos e inhibidores	47
1.5. Tampones y soluciones	48
1.6. Otros compuestos utilizados	48
2. Métodos	49
2.1. Animales y estabulación	49



2.2. Generación de ratones deficientes en Cot/tpl-2 (Cot/tpl-2 KO) y ratones sin actividad quinasa de Cot/tpl-2 (Cot/tpl-2 KD) y genotipado	49
2.3. Cultivo de macrófagos peritoneales	51
2.4. Cultivo de macrófagos derivados de la médula ósea	51
2.4.1. Diferenciación de células de la médula ósea a macrófagos	51
2.4.2. Generación de medio condicionado de fibroblastos L929	52
2.5. Análisis de marcadores de superficie por citometría de flujo	52
2.6. Medida de acumulación de óxido nítrico en macrófagos peritoneales	52
2.7. Inmunodetección de proteínas (Western blot)	53
2.7.1. Inmunodetección de proteínas en macrófagos	53
2.7.2. Estimulación con LPS <i>in vivo</i> e inmunodetección de proteínas en hígado y pulmón	54
2.8. Extracción de RNA total	54
2.9. Análisis del perfil de polisomas y fraccionamiento del mRNA en gradiente de sacarosa	54
2.10. Detección de mRNA por Northern blot	56
2.11. RT-PCR cuantitativa	56
2.11.1. RT-PCR cuantitativa de mRNA total	56
2.11.2. RT-PCR del mRNA fraccionado en gradiente de sacarosa	56
2.12. Marcaje metabólico con <sup>35</sup> S cisteína y metionina	57
2.13. Nucleofección de BMDM	57
2.14. Ensayos de precipitación con m <sup>7</sup> GTP-sefarosa	57
2.15. Microscopía de fluorescencia	58
2.16. Análisis de citoquinas y quimioquinas mediante Luminex	58
2.17. Análisis estadístico de los datos	58
<b>Resultados</b>	<b>61</b>
1. Los macrófagos deficientes en Cot/tpl-2 presentan mayor expresión de NOS2 en respuesta a LPS	61
2. La deficiencia de Cot/tpl-2 induce una fosforilación más sostenida de p38α y JNK1/2 y una menor recuperación de IκBα en macrófagos en respuesta a LPS	66

3. Cot/tpl-2 regula la activación de Akt y mTORC1 en macrófagos tras la estimulación con LPS	69
4. La inhibición de PI3K iguala los niveles de NOS2 e IκBα entre los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO en respuesta a LPS	72
5. Los macrófagos Cot/tpl-2 KD reproducen el fenotipo de los macrófagos Cot/tpl-2 KO	74
6. Cot/tpl-2 controla la fosforilación de Akt, la activación de mTORC1 y la expresión de NOS2 en respuesta a la activación de los receptores TLR3 y TLR2/6	77
7. Cot/tpl-2 regula la traducción Cap-dependiente en macrófagos BMDM estimulados con LPS	79
8. Cot/tpl-2 controla la traducción de los 5' TOP mRNAs eEF1α y eEF2	82
9. Cot/tpl-2 induce la traducción de proteínas involucradas en la señalización intracelular mediada por LPS en macrófagos	85
10. Cot/tpl-2 induce la expresión de los mediadores inflamatorios TNFα, IL-6 y KC en macrófagos BMDM	88
<b>Discusión</b>	<b>93</b>
1. Regulación de las distintas vías de señalización intracelular inducidas en respuesta a la estimulación de los TLRs por Cot/tpl-2-MKK1/2-Erk1/2	94
2. Regulación de la biosíntesis de proteínas por Cot/tpl-2 en respuesta a la estimulación por LPS	99
3. Control de la estabilidad de mensajeros de mediadores inflamatorios por Cot/tpl-2 en respuesta a LPS	102
4. Regulación de la activación de los macrófagos en respuesta a LPS por Cot/tpl-2	103
<b>Conclusiones</b>	<b>111</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>115</b>
<b>Anexo</b>	<b>125</b>

The background of the page is a dense, repeating pattern of microscopic images, likely showing cells or tissue structures, in a light gray tone. The pattern consists of various shapes, including circular and elongated forms, some with darker centers, creating a complex, organic texture.

## **ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS**



## Introducción

Figura 1. Representación de los distintos tipos de activación de los macrófagos.	24
Tabla 1. Características de los distintos tipos de TLRs.	26
Figura 2. Vías de señalización mediadas por TLRs: MyD88 dependiente y MyD88 independiente.	27
Figura3. Inhibición de la señalización mediada por TLR.	29
Figura 4. Representación de la cascada de señalización de las MAP quinasas.	29
Figura 5. Estructura de Cot/tpl-2.	30
Figura 6. Activación fisiológica de Cot/tpl-2.	31
Figura 7. Señalización mediada por el complejo mTORC1 (A) y mTORC2 (B).	37

## Materiales y métodos

Figura 1. Esquema representativo de la generación de ratones Cot/tpl-2 KO y Cot/tpl-2 KD y de los oligos utilizados para el genotipado.	50
Figura 2. Esquema del fraccionamiento de mRNA asociado a polisomas.	55

## Resultados

Figura 1. Cot/tpl-2 reprime la expresión de NOS2 <i>in vivo</i> .	61
Figura 2. Análisis de marcadores de superficie por citometría de flujo en macrófagos peritoneales obtenidos tras la inyección de tioglicolato en ratones Wt y Cot/tpl-2 KO.	62
Figura 3. Cot/tpl-2 reprime la expresión de NOS2 en macrófagos peritoneales...	63
Figura 4. Curva de dosis de NO en respuesta a LPS en macrófagos peritoneales Wt y Cot/tpl-2 KO.	64
Figura 5. Análisis por citometría de flujo de marcadores de superficie de macrófagos BMDM de ratones Wt y Cot/tpl-2 KO.	64
Figura 6. Expresión de NOS2 en macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO.	65
Figura 7. Inducción de transcritos de citoquinas y quimioquinas en macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO estimulados con LPS.	66

Figura 8: Estudio de la señalización intracelular inducida por LPS en macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO.	67
Figura 9. Localización subcelular de IRF3 en macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO estimulados con LPS.	68
Figura 10. Nivel de fosforilación de STAT1 en macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO estimulados con LPS.	69
Figura 11. Cot/tpl-2 induce la activación de Akt en serina 473 en macrófagos BMDM en respuesta a LPS.	70
Figura 12. Cot/tpl-2 controla la fosforilación de RSK y de sus dianas efectoras en macrófagos BMDM estimulados con LPS.	72
Figura 13. Control de las vías de señalización en respuesta a LPS en macrófagos peritoneales por Cot/tpl-2.	73
Figura 14. El tratamiento con wortmanina iguala los niveles de IκBα y NOS2 entre los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO en respuesta a LPS.	74
Figura 15. Los macrófagos Cot/tpl-2 KD presentan una menor fosforilación de Akt y de las dianas de mTORC1 y mayores niveles de expresión de NOS2 que los macrófagos Wt en respuesta a LPS.	75
Figura 16. La inhibición de Erk1/2 induce una menor fosforilación de Akt y de las dianas de mTORC1 y una mayor expresión de NOS2 en macrófagos Wt en respuesta a LPS.	76
Figura 17. Cot/tpl-2 controla la activación de las vías de Akt y mTORC1 y la expresión de NOS2 e IRF1 en respuesta a zymosan y a poly I:C.	78
Figura 18. Cot/tpl-2 no controla la activación de Akt, S6K1 y 4E-BP1 en macrófagos BMDM en respuesta a IL-10.	79
Figura 19. Cot/tpl-2 induce la disociación del complejo 4E-BP1-eIF4E en macrófagos estimulados con LPS.	80
Figura 20. Cot/tpl-2 induce la traducción Cap-dependiente.	81
Figura 21. Cot/tpl-2 induce la incorporación de <sup>35</sup> S en varias proteínas en respuesta a LPS.	81
Figura 22. Perfiles de polisomas de macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO en respuesta a LPS.	82


Figura 23. Cot/tpl-2 estimula el reclutamiento de los 5' TOP mRNAs eEF1α y eEF2 en las fracciones de polisomas.	84
Figura 24. El tratamiento con UO 126 reprime el reclutamiento de eEF1α en polisomas en macrófagos BMDM Wt estimulados con LPS.	85
Figura 25. Cot/tpl-2 activa la transcripción y traducción de SOCS1 y SOCS3 en macrófagos estimulados con LPS.	86
Figura 26. Cot/tpl-2 induce la traducción de IRF1 y de IκBα en respuesta a LPS.	87
Figura 27. Cot/tpl-2 induce la traducción de los mensajeros de TNFα, IL-6 y KC.	88
Figura 28. Cot/tpl-2 incrementa la estabilidad de los transcritos de TNFα, IL-6 y KC en macrófagos BMDM en respuesta a LPS.	89
Figura 29. Cot/tpl-2 induce la producción de TNFα, IL-6 y KC en macrófagos BMDM en respuesta a LPS.	90

## Discusión

Figura 1. Modelo propuesto de control de la vía de señalización de Akt y mTORC1 por Cot/tpl-2 en respuesta a la activación de los TLRs en macrófagos.	98
Figura 2. Modelo propuesto de control de la expresión de proteínas involucradas en el estado de activación de los macrófagos en respuesta a la activación de los TLRs por Cot/tpl-2.	107








## **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**



<b>4E-BP1:</b> proteína de unión a 4E 1.	<b>Gr1:</b> antígeno de diferenciación mieloide.
<b>5' TOP mRNA:</b> mRNA con región de pirimidinas en el extremo 5'.	<b>IFN:</b> interferon.
<b>5' UTR:</b> región 5' no traducida.	<b>IgE:</b> inmunoglobulina E.
<b>ABIN:</b> <i>A20-binding inhibitor of nuclear factor-kappa B</i> .	<b>IKK:</b> quinasa que fosforila a IκB.
<b>APC:</b> célula presentadora de antígeno.	<b>IL:</b> interleuquina o citoquina.
<b>ARE:</b> elemento rico en AU (adenina y uridina).	<b>IP-10 (CXCL-10):</b> quimioquina inducida por IFNγ 10.
<b>BMDM:</b> macrófagos derivados de la médula ósea.	<b>IRAK:</b> quinasa asociada al receptor de la interleuquina 1.
<b>Cap:</b> m <sup>7</sup> GTP unido al primer nucleótido del mRNA en el extremo 5'.	<b>IRES:</b> sitio interno de entrada del ribosoma.
<b>CCL-5:</b> quimioquina ligando 5 con motivos C-C.	<b>IRF:</b> factor regulador de interferon.
<b>CD:</b> cúmulo de diferenciación.	<b>IκB:</b> proteína reguladora inhibidora de NFκB.
<b>COX-2:</b> ciclo-oxigenasa 2.	<b>Jak:</b> <i>Janus</i> quinasa.
<b>CpG DNA:</b> ADN rico en islas CpG (citocina y guanina unidas por fosfatos).	<b>JNK:</b> quinasa que fosforila a la proteína c-jun en el dominio N-terminal.
<b>DAMPs:</b> patrones moleculares asociados a daño.	<b>KC (CXCL-1):</b> quimioquina derivada de queranocitos.
<b>dsRNA:</b> ARN de doble cadena.	<b>KD:</b> actividad quinasa inhibida.
<b>eEF:</b> factor de elongación eucariota.	<b>KO:</b> <i>knock out</i> .
<b>eEF2K:</b> quinasa de eEF2.	<b>LPS:</b> lipopolisacárido.
<b>eIF:</b> factor de iniciación eucariota.	<b>M1:</b> macrófagos activados por la vía clásica.
<b>Erk:</b> quinasa regulada por señales extracelulares.	<b>M2:</b> macrófagos activados por la vía alternativa.
<b>FBS:</b> suero fetal bovino.	<b>m<sup>7</sup>GTP:</b> 7 metil GTP (guanosina tri-fosfato).
<b>FOXO1:</b> factor de transcripción con dominio de unión a DNA tipo <i>forkhead</i> O1.	<b>MAP3K:</b> proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógenos.
<b>GM-CFU:</b> unidad formadora de colonias de granulocitos - macrófagos.	<b>MAPK:</b> proteína quinasa activada por mitógenos.
<b>GM-CSF:</b> factor estimulador de colonias de granulocitos – macrófagos.	<b>M-CSF:</b> factor estimulador de colonias de macrófagos.

<b>MEF:</b> fibroblastos embrionarios de ratón.	<b>RE:</b> retículo endoplasmático.
<b>MHC-II:</b> complejo mayor de histocompatibilidad II.	<b>rRNA:</b> ARN ribosómico.
<b>microRNA:</b> micro ARN.	<b>RSK:</b> quinasa ribosomal de S6.
<b>MIF:</b> media de intensidad de fluorescencia.	<b>S6:</b> proteína de la subunidad pequeña del ribosoma.
<b>MIP-1<math>\beta</math>:</b> proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\beta$ .	<b>S6K1:</b> proteína quinasa de S6 1.
<b>MKK:</b> MAP quinasa quinasa.	<b>SD:</b> desviación estándar.
<b>MNK:</b> quinasa que interacciona con MAP quinasas.	<b>SOCS:</b> supresor de la señalización mediada por citoquinas.
<b>mRNA:</b> ARN mensajero.	<b>ssRNA:</b> ARN de cadena simple.
<b>mRNP:</b> mensajero ribonucleoproteico.	<b>STAT:</b> <i>signal transducers and activators of transcription</i> .
<b>mTORC:</b> complejo diana de rapamicina de mamíferos.	<b>TAK1:</b> quinasa activada por TGF $\beta$ .
<b>MyD88:</b> gen de respuesta de la diferenciación mieloide primaria 88.	<b>TBK1:</b> <i>TANK-binding kinase 1</i> .
<b>NF<math>\kappa</math>B:</b> factor nuclear kappa B.	<b>TCR:</b> receptor de células T.
<b>NK:</b> linfocitos citolíticos naturales.	<b>TGF<math>\beta</math>:</b> factor de crecimiento transformante 1.
<b>NO:</b> óxido nítrico.	<b>Th:</b> linfocito T colaborador.
<b>NOS2:</b> enzima óxido nítrico sintasa 2.	<b>TIRAP:</b> proteína adaptadora con dominio de unión al receptor TLR/IL-1.
<b>PAMPs:</b> patrones moleculares asociados a patógenos.	<b>TLR:</b> receptor tipo Toll.
<b>PDK1:</b> proteína quinasa dependiente de fosfatidil inositol.	<b>TNF<math>\alpha</math>:</b> factor necrótico de tumores $\alpha$ .
<b>PGE<sub>2</sub>:</b> prostaglandina E <sub>2</sub> .	<b>TRAF6:</b> factor asociado al receptor TNF 6.
<b>PI3K:</b> quinasa que fosforila al fosfatidil inositol-4,5-bifosfato en la posición 3.	<b>TRAM:</b> molécula adaptadora asociada con TRIF.
<b>PIP2:</b> fosfatidil inositol-4,5-bifosfato.	<b>TRIF:</b> adaptador con dominio TIR que induce la producción de IFN $\beta$ .
<b>PIP3:</b> fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato.	<b>TSC:</b> complejo de la esclerosis tuberosa.
<b>PRR:</b> receptores de reconocimiento de patrones.	<b>Wt:</b> salvaje.

The background of the entire page is a dense, monochromatic pattern of microscopic images, likely showing various types of cells or microorganisms in shades of gray. This pattern serves as a textured backdrop for the text.

## **INTRODUCCIÓN**





## 1. El sistema inmune

Todos los organismos vivos están expuestos constantemente a microorganismos infecciosos presentes en el entorno y necesitan hacer frente a la invasión de estos patógenos. La defensa del organismo frente a agentes extraños está mediada por el sistema inmune. La respuesta inmune en vertebrados está formada por dos componentes: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. Ambos componentes reconocen a los microorganismos invasores como agentes ajenos al propio organismo activando respuestas específicas para eliminarlos (84, 123).

### 1.1. El sistema inmune innato

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo frente a la infección de agentes patógenos. Es el mecanismo de defensa más antiguo y conservado evolutivamente y está presente en todos los organismos multicelulares. Comprende los mecanismos de defensa bioquímicos y celulares presentes en el huésped antes de que se inicie la infección, estando preparado para responder con rapidez ante ella. Las células del sistema inmune innato reaccionan específicamente frente a estructuras comunes conservadas en grupos de microorganismos distintos, gracias a receptores invariables codificados en la línea germinal (84, 123). Tradicionalmente se ha considerado que la respuesta inmune innata carece de memoria, respondiendo de la misma forma frente a infecciones sucesivas de un mismo patógeno. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que algunos componentes de la respuesta inmune innata, como las células asesinas naturales, presentan capacidad de memoria (100).

Los principales componentes del sistema inmune innato son (95, 123):

- Barreras físicas y químicas: comprenden epitelios y sustancias antimicrobianas sintetizadas en las superficies epiteliales que impiden la entrada de los patógenos en el organismo.
- Neutrófilos, células dendríticas y macrófagos: son células fagocíticas que engullen y digieren patógenos y partículas nocivas para el organismo. Además, las células dendríticas y los macrófagos son células presentadoras de antígeno (APCs) que activan a las células del sistema inmune adaptativo.
- Mastocitos, basófilos y eosinófilos: son células que secretan proteínas muy tóxicas relacionadas con la eliminación de parásitos y bacterias. Están implicadas en procesos alérgicos.

- Linfocitos citolíticos naturales (NK, Natural Killer): atacan y destruyen células infectadas por virus y células tumorales.
- Sistema del complemento: son moléculas plasmáticas que opsonizan o recubren la superficie de los patógenos resultando en la citólisis de las células infectadas y participan en el reclutamiento de células inflamatorias en el foco de la infección causando la muerte del patógeno.

### 1.2. El sistema inmune adaptativo

El sistema inmune adaptativo distingue moléculas específicas incluso de microorganismos muy relacionados entre sí, gracias a receptores específicos de antígeno que se generan al azar por reordenamiento e hipermutación de genes. Cada célula posee un determinado receptor y aquella célula que reconoce al antígeno se expande clonalmente. Además, el sistema inmune adaptativo posee capacidad de memoria, aumentando su respuesta en magnitud y capacidad de defensa con cada exposición sucesiva a un microorganismo determinado. Este sistema está sólo presente en vertebrados (84, 110, 123).

Los principales componentes del sistema inmune adaptativo son (55, 82, 110-112, 119):

- Citoquinas y quimioquinas: son proteínas solubles que regulan la comunicación entre células del sistema inmune. Forman parte del sistema inmune innato y del adaptativo.
- Linfocitos T citotóxicos (Tc) ( $CD3^+CD8^+$ ): destruyen células que presentan antígenos extraños al propio organismo, como células infectadas por virus u otros microorganismos intracelulares.
- Linfocitos T colaboradores (Th) ( $CD3^+CD4^+$ ): en respuesta a la estimulación por antígenos específicos, producen citoquinas que estimulan la proliferación y activación de diversas células del sistema inmune como los linfocitos T citotóxicos y los macrófagos. En función de los estímulos presentes durante la respuesta inmune se diferencian a tipo Th1, Th2 o Th17 que secretan grupos de citoquinas diferentes, generándose una respuesta inmune determinada.
- Células asesinas naturales T (NKT): comparten características de las células NK y de los linfocitos T.
- Linfocitos B ( $CD19^+$ ): son las únicas células capaces de producir anticuerpos al reconocer antígenos extracelulares. Son también células presentadoras de antígeno.



- Linfocitos T, NKT y linfocitos B reguladores: inhiben la respuesta inmune, evitando una respuesta inmune excesiva y manteniendo así la homeostasis del organismo.

El sistema inmune innato y adaptativo forman un sistema de defensa integrado. Por un lado, la estimulación y el tipo de respuesta inmune adaptativa depende de la activación de la respuesta inmune innata. Por otro lado, el sistema inmune adaptativo estimula al sistema inmune innato aumentando su capacidad antimicrobiana y a su vez, utiliza componentes del sistema inmune innato para eliminar los microorganismos (84, 123).

## 2. Los macrófagos en el sistema inmune

Los macrófagos, células implicadas en la respuesta inmune innata, son elementos clave en la defensa del organismo y en la inflamación. El desarrollo de los macrófagos comienza en la médula ósea, donde una célula madre precursora se diferencia a una unidad formadora de colonias de granulocitos - macrófagos (GM-CFU), que es el precursor común de células mieloides: macrófagos, granulocitos (basófilos, eosinófilos y neutrófilos) y células dendríticas mieloides. Posteriormente, este precursor común se diferencia a monoblasto, posteriormente a pro-monocito y finalmente a monocito. Esta diferenciación está dirigida por los factores estimuladores de colonias, GM-CSF y M-CSF. A continuación, los monocitos son exportados al torrente sanguíneo y llegan a los tejidos diana atraídos por las quimioquinas producidas por el microambiente local. Una vez en el tejido, el monocito sufre un proceso de diferenciación a macrófago o a célula dendrítica. Los monocitos y los macrófagos expresan marcadores de superficie propios del linaje celular (F4/80) y comunes con otras células inmunes (Gr1, CD11a, CD11b y CD11c), cuyo grado de expresión varía según el estado de diferenciación/activación de estas células. Todos estos precursores y células diferenciadas forman parte del sistema fagocítico mononuclear (45, 78, 89, 118).

Los macrófagos son células heterogéneas y polivalentes indispensables en el desarrollo embrionario, la homeostasis, la inflamación, la eliminación de patógenos y la curación de heridas, contribuyendo a la defensa del huésped y a la reparación y remodelación de los tejidos (20, 45, 89).

Su función y morfología depende directamente del tejido en el que se halle el macrófago y de hecho se les ha dado distinto nombre según su localización. De esta forma tenemos por ejemplo la microglía en el sistema nervioso central, los osteoclastos en el hueso, las células de Kupffer en el hígado, los macrófagos alveolares en el pulmón o las células de Langerhans en la epidermis (45, 89).

En respuesta a una infección o a inflamación estéril inducida por daño tisular, los monocitos circulantes son reclutados en el foco de la inflamación y se diferencian a macrófagos. Estos macrófagos poseen una plasticidad inherente de llevar a cabo distintos programas de activación funcionalmente específicos según los distintos patrones de moléculas que se encuentran en los patógenos o en las células del huésped necrosadas y en función de las citoquinas presentes en el microambiente inflamatorio. Existen tres estados generales de activación de los macrófagos: activación clásica o M1, activación alternativa o M2 y desactivación (78, 88, 89) (Figura 1).

### 2.1. Activación clásica de los macrófagos o M1

Tras el reconocimiento de patrones moleculares de patógenos como el lipopolisacárido (LPS), componente mayoritario de la pared de las bacterias Gram negativas, y/o en presencia de citoquinas pro-inflamatorias producidas por las células Th1 y NK (principalmente IFN $\gamma$ ), los macrófagos se activan por la vía denominada clásica o M1 convirtiéndose en células efectoras que inhiben el crecimiento bacteriano y la replicación viral (78, 89, 127).

Los macrófagos M1 producen citoquinas pro-inflamatorias como los interferones de tipo I (IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ ), TNF $\alpha$ , IL-12, IL-6 e IL-1 $\beta$  y quimioquinas pro-inflamatorias como KC (CXCL-1), IP-10 (CXCL-10) y CCL-5. Además, también inducen la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa 2 o inducible (NOS2) que produce óxido nítrico (NO), una molécula citotóxica. Estos mediadores inflamatorios inducen la fagocitosis y la destrucción de los microorganismos intracelulares fagocitados (76, 78, 127).

La activación de los macrófagos por la vía clásica, induce a su vez la polarización de los linfocitos colaboradores a tipo Th1, mediante la presentación de antígenos a los linfocitos Th a través del complejo mayor de histocompatibilidad MHC-II y de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, así como por la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-12. De forma que se genera un sistema de

retroalimentación positiva que aumenta la actividad citotóxica y la expresión de MHC-II, CD80 y CD86 en la superficie de los macrófagos (127).

Por otro lado, el óxido nítrico producido por estas células actúa como un transductor de señales autocrino y paracrino, regulando la producción de citoquinas, la maduración de las NK y de los macrófagos, la proliferación de las células T, y la adhesión de plaquetas, leucocitos y neutrófilos durante la respuesta inmune (12, 14, 29, 81). Además, se requiere el óxido nítrico para la respuesta polarizada a Th1 en infecciones de microbios intracelulares (13, 14, 29).

## 2.2. Activación alternativa de los macrófagos o M2

En presencia de algunas citoquinas anti-inflamatorias, como IL-4 e IL-13, producidas por los linfocitos Th2, los mastocitos y los eosinófilos; los macrófagos son activados de forma alternativa o M2 para combatir parásitos y patógenos extracelulares. Esta vía alternativa de activación produce la inhibición parcial de la liberación de proteínas pro-inflamatorias y de la producción de óxido nítrico (44, 89).

El gen inducido por los macrófagos M2 más conocido es Arginasa 1. NOS2 y Arginasa 1 compiten por el mismo sustrato, L-arginina. Mientras que NOS2 forma óxido nítrico, la enzima Arginasa 1 sintetiza ornitina y poliaminas, induciendo el crecimiento celular y la reparación tisular mediante la producción de colágeno (44, 89).

La activación alternativa de los macrófagos no antagoniza simplemente las vías de señalización inducidas por la respuesta M1, ya que por ejemplo la citoquina IL-4 también estimula la endocitosis y la expresión de MHC-II, estimulando la presentación de antígeno a los linfocitos T colaboradores (44).

Además, los macrófagos tipo M2 inducen la proliferación de las células Th2, la fagocitosis de desechos celulares y están involucrados en el desarrollo de la alergia y el asma; estimulando a los eosinófilos y basófilos, y activando la producción de IgE por los linfocitos B (34, 44, 88, 89).

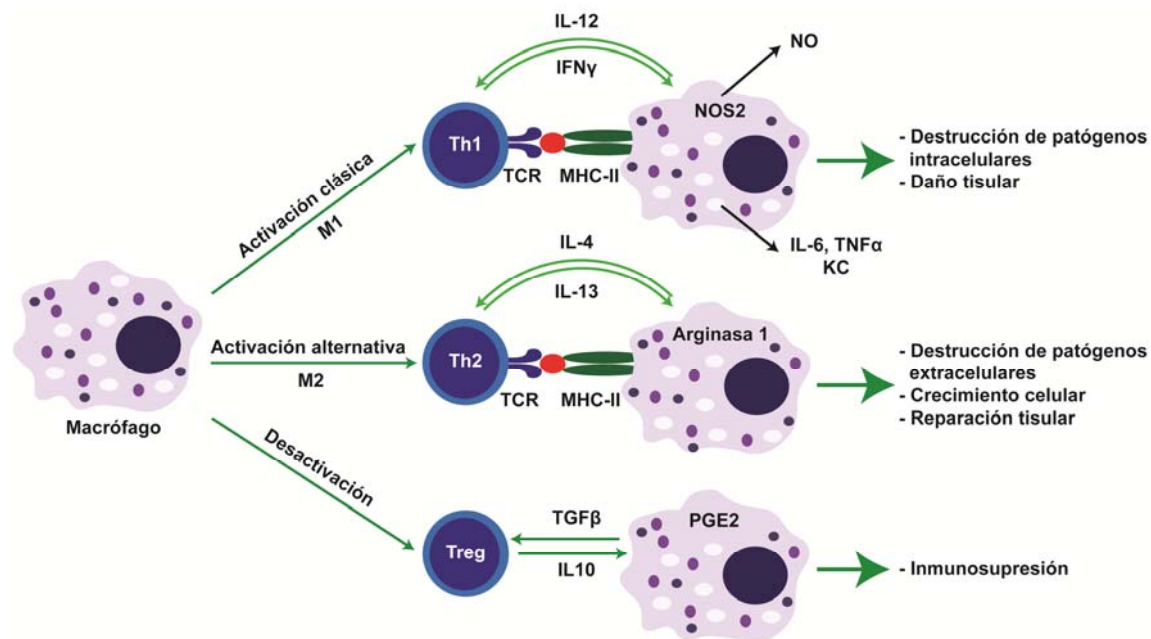
## 2.3. Desactivación de los macrófagos

La desactivación de los macrófagos es un proceso activo y controlado que suprime los programas inmunogénicos e inflamatorios de los macrófagos resultando en la resolución de la inflamación, evitando así el daño celular (78, 88).

Inicialmente las moléculas pro-inflamatorias secretadas por los macrófagos sirven para eliminar los agentes extraños, pero una excesiva respuesta puede

culminar en daño al DNA, tisular e incluso sepsis; por lo que se necesita un sistema capaz de controlar la magnitud y duración de las respuestas inflamatorias (78, 88).

La desactivación de los macrófagos está inducida por las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF $\beta$  producidas por los linfocitos T reguladores y por glucocorticoides principalmente. Estos componentes inhiben potentemente la transcripción génica de NOS2, COX2 y TNF $\alpha$ , y la presentación antigénica a los linfocitos T colaboradores, mediante la inhibición de la expresión de MHC-II. Además, la activación de los macrófagos por IFN $\gamma$ , IL-4 y/o LPS, induce rápidamente la expresión de proteínas supresoras de la señalización de las citoquinas (SOCS), que inhiben las vías de señalización inducidas por citoquinas y por LPS. A su vez, la activación del mediador pro-inflamatorio COX2 en los macrófagos activados induce la formación de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), que es una lipoxina inmunosupresora que induce la producción de IL-10. De esta forma los macrófagos controlan la homeostasis celular mediante sistemas de retroalimentación negativa (44, 78, 88).



**Figura 1. Representación de los distintos tipos de activación de los macrófagos.**

Los macrófagos no están permanentemente en uno de los tres estados descritos anteriormente, sino que son células plásticas capaces de polarizar de distinta forma dependiendo del microambiente local (34, 89).

### 3. Los TLRs en el sistema inmune innato

Como se ha descrito anteriormente, los macrófagos reconocen moléculas conservadas asociadas a microorganismos induciéndose su activación. Estos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) activan a los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs). El principal tipo de PRR son los receptores tipo Toll (TLRs). Los TLRs reconocen los distintos PAMPs distinguiéndolos de moléculas propias del organismo, activando al sistema inmune innato y subsecuentemente al sistema inmune adaptativo, permitiendo la erradicación de los patógenos invasores (56, 97). Los TLRs también se activan durante la inflamación estéril mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a daño en el organismo (DAMPs), presentes en moléculas del huésped que se liberan al medio extracelular durante los procesos de muerte celular por necrosis y daño tisular (73).

El receptor tipo Toll es un receptor transmembrana tipo I, conservado evolutivamente y presente en insectos, plantas y mamíferos. El dominio extracelular contiene motivos ricos en leucina responsables del reconocimiento de los patógenos, denominado LRR; mientras que el dominio citoplasmático posee un dominio homólogo a los receptores de la IL-1 responsable de la señalización intracelular, denominado dominio Toll/IL-1R (TIR) (1).

En mamíferos, han sido identificados 11 miembros de la familia TLR. Están localizados en distintos compartimentos celulares: membrana plasmática, retículo endoplasmático (RE) y endosomas. Pese a la alta conservación existente en el dominio extracelular, los diferentes TLRs reconocen motivos conservados de microorganismos no relacionados estructuralmente, así como distintas moléculas endógenas liberadas tras daño tisular (61, 117) (Tabla 1).

TLR	UBICACIÓN	LIGANDO	ORIGEN LIGANDO	CO-RECEPTOR	ADAPTADOR
<b>TLR1</b>	Membrana plasmática	Triacil-lipopéptidos Factores solubles	Bacterias y micobacterias <i>Neisseria meningitidis</i>	TLR2	TIRAP MyD88
<b>TLR2</b>	Membrana plasmática	Lipoproteínas Ácido lipoteicoico Peptidoglicanos Zymosan Proteínas huésped	Varios patógenos Bacterias Gram + Bacterias Gram + Hongos Huésped	TLR1 y TLR6	TIRAP MyD88
<b>TLR3</b>	Endosoma RE	dsRNA Poly I:C	Virus Compuesto sintético		TRIF
<b>TLR4</b>	Membrana plasmática RE	LPS Taxol Proteínas virales Proteínas huésped	Bacterias Gram – Plantas Virus Huésped	MD2, CD14, LBP, RP105	TIRAP, MyD88, TRAM y TRIF
<b>TLR5</b>	Membrana plasmática	Flagelina	Bacterias flageladas		MyD88
<b>TLR6</b>	Membrana plasmática	Diacil-lipopéptidos Ácido lipoteicoico Zymosan	<i>Mycoplasma</i> Bacterias Gram + Hongos	TLR2	TIRAP, MyD88
<b>TLR7</b>	Endosoma RE	Imidazoquinolinas Loxirribina ssRNA	Compuesto químico Compuesto químico Virus		MyD88
<b>TLR8</b>	Endosoma RE	Imidazoquinolinas ssRNA	Compuesto químico Virus		MyD88
<b>TLR9</b>	Endosoma RE	CpG DNA no metilado DNA mitocondrial	Virus y bacterias Huésped		MyD88
<b>TLR11</b>	Membrana plasmática	Proteínas tipo profilina	Bacterias uropatológicas		MyD88

**Tabla 1. Características de los distintos tipos de TLRs.**

Cuando un ligando se une a su receptor TLR, éste dimeriza induciéndose la conformación necesaria para reclutar moléculas implicadas en la transmisión de la señal. Según las moléculas adaptadoras que reclute, la señalización celular mediada por los TLRs se divide en dos grandes grupos: señalización MyD88 dependiente y señalización MyD88 independiente (1, 61) (Figura 2).

### 3.1 Vía de señalización MyD88 dependiente

Todos los TLRs, excepto el TLR3, reclutan el adaptador MyD88 cuando son activados. A continuación, MyD88 recluta a IRAK4 y a IRAK1. IRAK4 fosforila a IRAK1, lo que conduce al reclutamiento de TRAF6 al complejo del receptor. Posteriormente, el

complejo IRAK1-TRAF6 se disocia del receptor e interacciona con la MAP quinasa quinasa TAK1 produciendo su activación. TAK1 activa a las vías de las MAP quinasa p38 $\alpha$  y JNK1/2 y al complejo IKK. El complejo IKK induce la activación de la vía de la MAPK Erk1/2 y la fosforilación y degradación de I $\kappa$ B vía proteasoma, liberando al factor de transcripción NF $\kappa$ B (7). Las MAPKs y NF $\kappa$ B activan la transcripción de mediadores pro-inflamatorios (7, 27, 90). NF $\kappa$ B también induce la expresión del factor de transcripción IRF1 (54). Ambos factores de transcripción inducen la expresión de NOS2 (63).

### 3.2 Vía de señalización MyD88 independiente

Por otro lado, el TLR4 y el TLR3 reclutan al adaptador TRIF, que interacciona con TBK1. TBK1 activada interacciona con IKK $\epsilon$  y fosforila al factor de transcripción IRF3. IRF3 fosforilado dimeriza y se transloca al núcleo induciendo la transcripción de genes IFN tipo I. Además, TRIF interacciona con TRAF6 activando a TAK1 y por tanto induce también la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B y de las MAP quinasa (135).

La producción de IFN tipo I en respuesta a la activación de los TLRs, induce a su vez la activación autocrina y paracrina de la vía de señalización Jak/STAT1 (120). La activación de la señalización Jak/STAT1 induce la dimerización del factor de transcripción STAT1 que se transloca al núcleo activando la transcripción de genes diana, como por ejemplo NOS2, IRF1, IFN $\gamma$ , CCL-5 o IP-10 (63, 93).

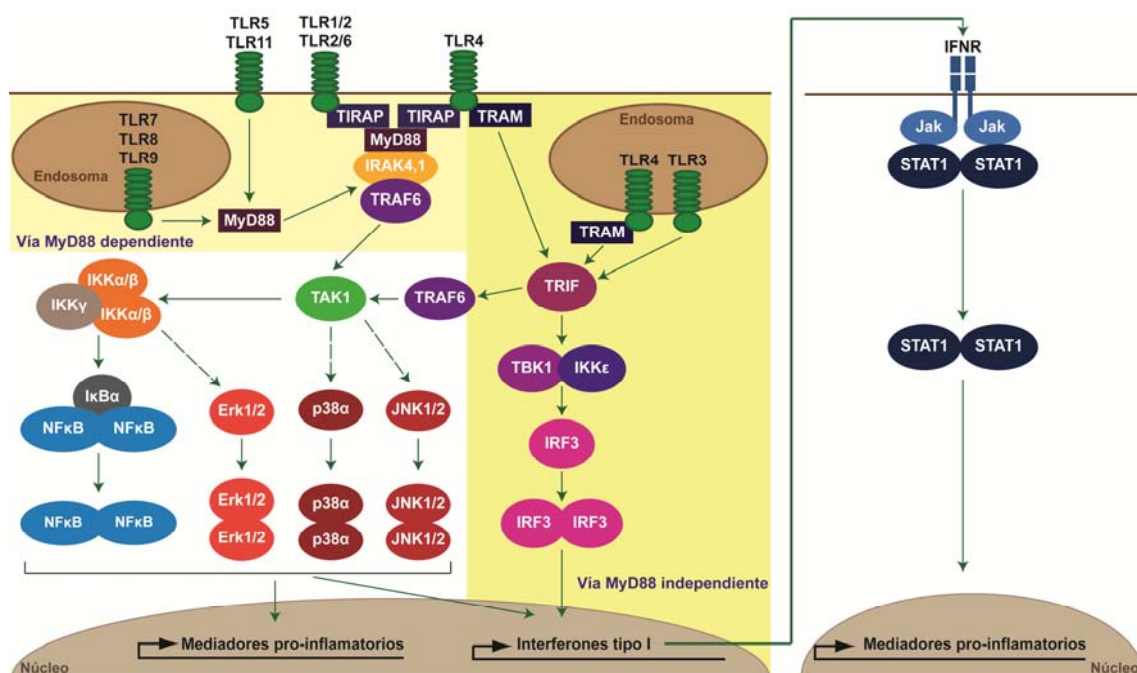


Figura 2. Vías de señalización mediadas por TLRs: MyD88 dependiente y MyD88 independiente.



La estimulación de los TLRs es esencial para la activación de la respuesta inflamatoria y la erradicación de los microorganismos infecciosos. Sin embargo, una activación de la respuesta inmune prolongada y excesiva es perjudicial para el huésped, y en algunos casos incluso fatal, debido al severo daño tisular y al fallo circulatorio (28, 36, 50).

### 3.3 Inhibición de la señalización mediada por los TLRs

Existen dos mecanismos de regulación negativa de la señalización mediada por los TLRs durante la respuesta inmune innata: la inhibición temprana, regulada por modificaciones post-traduccionales de proteínas (fosforilaciones), y la inhibición tardía, regulada por la expresión de genes específicos (24, 35, 36) (Figura 3).

#### 3.3.1. Inhibición temprana de la señalización por TLR: PI3K

La mayoría de los TLRs tras el reconocimiento del patógeno activan también la vía de señalización de PI3K. PI3K es una enzima que cataliza la conversión del fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PIP2) a fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), activando así a la quinasa PDK1 y subsecuentemente, PDK1 activa a Akt/PKB por fosforilación en el bucle de activación de esta quinasa, en el residuo T308. Akt inhibe la activación de las MAP quinasas p38 $\alpha$ , JNK1/2 y Erk1/2, así como la translocación de NF $\kappa$ B al núcleo, inhibiendo la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-12 y TNF $\alpha$  y la producción de óxido nítrico. Además, PI3K se activa en respuesta a la estimulación por IL-13 e IL-10, estando implicada en la inhibición la respuesta inmune tipo Th1 (35, 36).

#### 3.3.2. Inhibición tardía de la señalización por TLR: SOCSs

La activación de los TLRs induce un segundo mecanismo de retroalimentación negativa, estimulando la transcripción de genes supresores de la señalización por citoquinas denominados SOCS. Las proteínas SOCS inhiben la transducción de las vías de señalización inducidas en respuesta a LPS, modulando negativamente la señalización mediada por los TLRs. A su vez, las proteínas SOCSs inhiben la vía de señalización de las Jak/STAT inducida por citoquinas, resultando en tolerancia antigénica (24, 35).



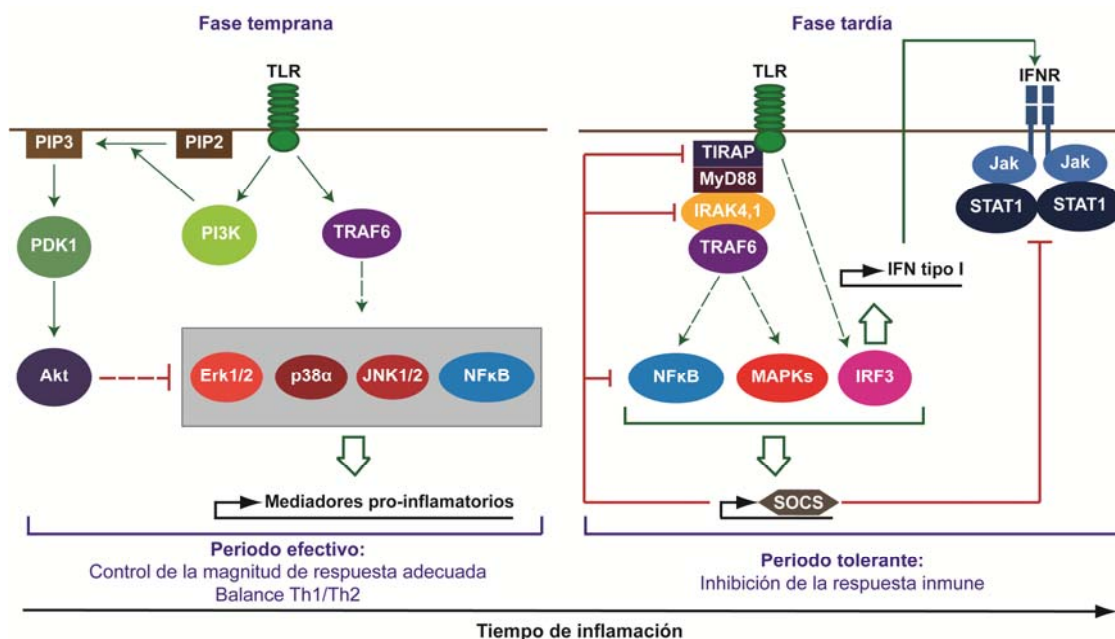


Figura 3. Inhibición de la señalización mediada por TLR.

#### 4. Papel fisiológico de las MAP quinasas. La MAP3K8 Cot/tpl-2

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos o MAP quinasas (MAPKs), se estimulan por factores de crecimiento, mitógenos, estrés y citoquinas pro-inflamatorias principalmente, llevando a cabo multitud de procesos celulares como desarrollo, crecimiento y diferenciación celular, apoptosis e inflamación (68).

Cada subfamilia está compuesta por un modulo de señalización de tres quinasas evolutivamente conservadas que se activan de forma secuencial: las MAP3Ks activan a las MAP2Ks y estas a las MAPKs, mediante fosforilaciones en residuos de serina y treonina o de treonina y tirosina (68) (Figura 4).

MAP3Ks	Raf, c-Mos, MEKKs Cot/tpl-2	MEKKs, MLKs, TAK1, ASK1/2	MTK1, MLKs, DLK TAK1, ASK1	MEKK2/3
MAP2Ks	MKK1/2	MKK4/7	MKK3/6	MKK5
MAPKs	Erk1/2	JNK	p38	ERK5

Figura 4. Representación de la cascada de señalización de las MAP quinasas.

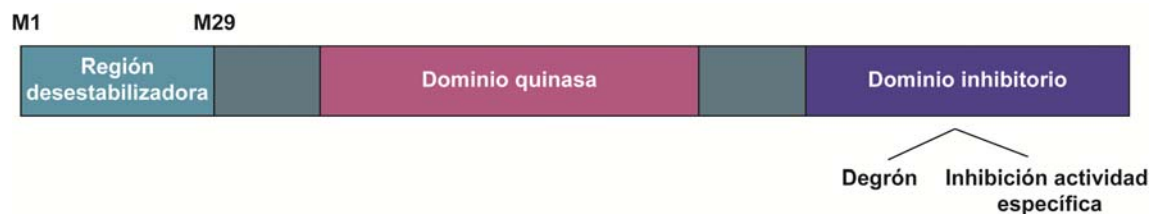
En el sistema inmune distintas MAP3Ks activan a sus correspondientes MAP2Ks y MAPKs en respuesta a diversos estímulos, generando respuestas específicas. En esta Tesis nos hemos centrado en el estudio de la MAP3K8: Cot/tpl-2.

#### 4.1. Descubrimiento y caracterización de Cot/tpl-2

La MAP3K Cot fue identificada como una forma oncogénica truncada/modificada en el extremo 3' por su capacidad de inducir transformación en células transfectadas con el DNA genómico de una línea celular proveniente de un carcinoma humano de tiroides (87). Asimismo, el gen murino homólogo de Cot, tpl-2, fue también identificado como una proteína truncada/modificada en el dominio C-terminal, a consecuencia de la inserción del provirus de la leucemia de Moloney en rata (98) o del provirus del tumor de mama de ratón en el último intrón del gen tpl-2 (33).

Ambas formas oncogénicas, murina y humana, no expresan el dominio C-terminal de la proteína que contiene un degrón que señala para su degradación vía proteasoma y además inhibe su actividad quinasa específica. Así, Cot/tpl-2 truncada presenta mayor vida media y mayor actividad específica, incrementándose su actividad quinasa (17, 39).

El transcrito Cot/tpl-2 tiene dos metioninas alternativas de iniciación de la traducción, una en la metionina 1 y otra en la metionina 29, que dan lugar a dos isoformas de 58 y 52 kDa, ambas localizadas predominantemente en el citoplasma. La isoforma M29 presenta mayor vida media que la isoforma M1, sugiriendo que contiene otra señal que señala esta proteína para su degradación (4) (Figura 5).



**Figura 5. Estructura de Cot/tpl-2.**

Existen otras alteraciones génicas relacionadas con un aumento en la estabilidad del transcrito de Cot/tpl-2 y con un aumento de su locus genómico que también están asociadas a transformación celular (33, 98). Sin embargo, aunque inicialmente se pensó que Cot/tpl-2 estaba implicada en la regulación de señales proliferativas debido a su identificación como un oncogén, más recientemente se ha demostrado que los ratones deficientes en Cot/tpl-2 son resistentes a la patología inducida por LPS/ D-galactosamida, debido a la disminución de la producción de TNF $\alpha$  entre otras citoquinas (30). Actualmente, está aceptado que Cot/tpl-2 está implicada fisiológicamente en la regulación de la respuesta inmune y adaptativa.

## 4.2. Papel fisiológico de Cot/tpl-2

### 4.2.1. Activación de Cot/tpl-2 en respuesta a estímulos extracelulares

En células no estimuladas, Cot/tpl-2 forma un complejo estable e inactivo con p105-NFκB y ABIN-2 entre otras proteínas (11, 69, 131, 132). p105-NFκB interacciona con dos dominios de Cot/tpl-2 (9). Por un lado, interacciona con el dominio C-terminal donde se localiza la señal de degradación, protegiendo a Cot/tpl-2 de la degradación vía proteasoma y por otro lado, interacciona con el dominio quinasa impidiendo que Cot/tpl-2 interaccione y subsecuentemente fosforile a sus sustratos (5, 9, 69). También se ha comprobado que la interacción de Cot/tpl-2 con ABIN-2 es necesaria para proteger a Cot/tpl-2 de su degradación vía proteasoma. Sin embargo, ABIN-2 no bloquea la actividad quinasa de Cot/tpl-2 (96, 128).

En respuesta a la estimulación de la superfamilia de receptores TLR/IL-1 y de algunos receptores de la familia TNFα, incluyendo el receptor CD40, se activa el complejo IKK. IKKβ activada fosforila a p105-NFκB en diferentes residuos marcándola para su proteólisis parcial vía proteasoma a p50-NFκB, subunidad del factor de transcripción NFκB (52, 94, 125). Consecuentemente, Cot/tpl-2 se disocia del complejo (9, 10, 131, 132). Para la activación de Cot/tpl-2 se requiere además su fosforilación en el residuo T290, situado en el bucle de activación de la quinasa, y en el residuo S400 (22, 23, 77, 103, 114). No se ha identificado la quinasa o quinasas que fosforilan a Cot/tpl-2 en estos residuos, pero se ha demostrado que la activación de Cot/tpl-2 necesita la actividad tirosina quinasa de la familia SRC en respuesta a la estimulación con IL-1 (104). Cot/tpl-2 también se autofosforila en el residuo S62, aumentando su capacidad de activar a su sustrato MKK1/2 (114). Una vez que Cot/tpl-2 se disocia del complejo y se activa, es degradada rápidamente vía proteasoma (131, 132) (Figura 6).

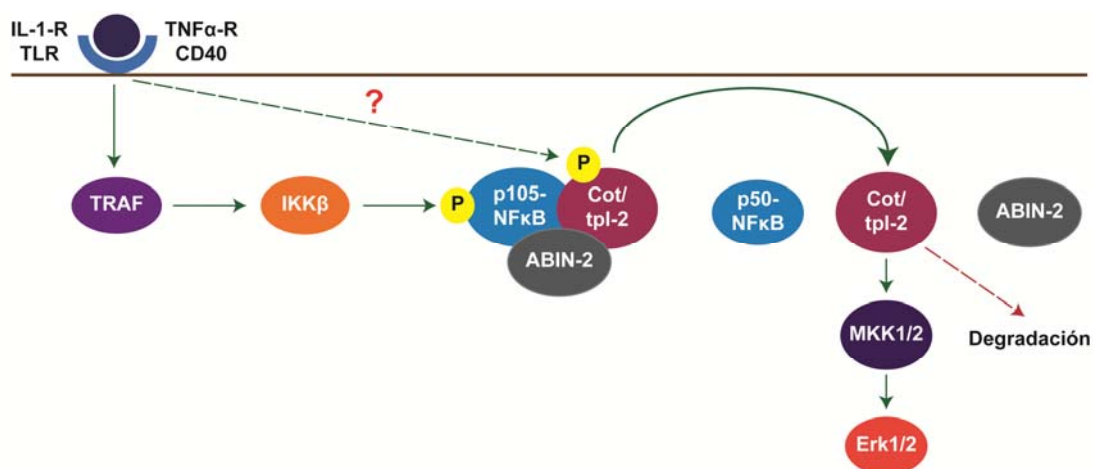


Figura 6. Activación fisiológica de Cot/tpl-2.

### 4.2.2. Señales intracelulares inducidas por Cot/tpl-2.

En estudios llevados a cabo sobreexpresando Cot/tpl-2, tanto en la forma salvaje (Wt) como truncada, se observó que Cot/tpl-2 promueve la activación de las MAP quinasas Erk1/2, JNK1/2, p38 $\alpha$  y Erk5 y de diversos factores de transcripción como AP-1, NFAT y NF $\kappa$ B (21, 99, 109).

Sin embargo, estudios posteriores con ratones deficientes en Cot/tpl-2 (Cot/tpl-2 KO) están aportando datos más específicos sobre el papel fisiológico de Cot/tpl-2. Así, se ha demostrado que en macrófagos estimulados con LPS o TNF $\alpha$ , en células B tras la estimulación del CD40 y en células HeLa o MEF estimuladas con IL-1 $\beta$ ; Cot/tpl-2 es necesaria para la activación de Erk1/2 pero no de JNK1/2 ni de p38 $\alpha$  (25, 32, 104). Sin embargo, en células MEF estimuladas con TNF $\alpha$ , Cot/tpl-2 es necesaria tanto para la activación de Erk1/2 como de JNK1/2 y NF $\kappa$ B (25). Asimismo, Cot/tpl-2 es necesaria para la activación de p38 $\alpha$  en células dendríticas tras la estimulación del TLR9 por CpG (59). Por lo que la señalización inducida por Cot/tpl-2 es específica de estímulo y tipo celular.

### 4.2.3. Implicación de Cot/tpl-2 en la respuesta inmune e inflamación

Cot/tpl-2 es la única quinasa capaz de fosforilar Erk1/2 en respuesta a la activación de los receptores TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9 y TNF $\alpha$  en macrófagos y células dendríticas, del receptor CD40 en linfocitos B, y del receptor de IL-1 $\beta$  en células HeLa (16, 30, 31, 132). La ablación de Cot/tpl-2 bloquea parcialmente la secreción de TNF $\alpha$  e IL-10 y la producción de COX2 en macrófagos estimulados con LPS; la secreción de IgE en células B y la producción de IL-8 y MIP-1 $\beta$  en células HeLa estimuladas con IL-1 $\beta$  (8, 31, 32, 74, 104).

Además, se ha demostrado que los ratones deficientes en la proteína Cot/tpl-2 muestran mayor producción de IL-12 y de IFN $\gamma$  y una menor producción de IL-10 en respuesta a la activación del TLR4 por LPS y a la activación del TLR9 por CpG que los ratones Wt (59, 116), por lo que Cot/tpl-2 ha emergido como un regulador negativo de la respuesta inmune tipo Th1.

También se ha demostrado que Cot/tpl-2 desempeña un papel importante en el desarrollo de procesos inflamatorios *in vivo*. De hecho, los ratones Cot/tpl-2 KO presentan una reducción en la inflamación pancreatítica inducida por caerulina (126). Además, Cot/tpl-2 está implicada en el inicio de la enfermedad de Crohn (65), así como en la inflamación periférica aguda y en la hipernocicepción inducida por zymosan (113).

#### 4.3. Cot/tpl-2 como diana de drogas anti-inflamatorias

Las MAP3Ks Cot/tpl-2 y Raf son capaces de activar MKK1/2-Erk1/2, induciendo la fosforilación de múltiples sustratos. Sin embargo, mientras que Raf activa Erk1/2 en respuesta a la activación de señales proliferativas, Cot/tpl-2 activa Erk1/2 en respuesta a PAMPs y a citoquinas pro-inflamatorias. El papel de Cot/tpl-2 en inmunidad e inflamación no puede ser remplazado por ninguna otra proteína, lo que la convierte en una buena diana para desarrollar nuevas drogas anti-inflamatorias (18, 37, 38). De hecho, varios grupos y compañías están desarrollando compuestos orgánicos pequeños que inhiben específicamente la actividad quinasa de Cot/tpl-2 bloqueando su centro activo así como ribozimas que degradan específicamente el mRNA de Cot/tpl-2 (19, 47, 58, 71, 72). Futuros estudios determinarán si estos compuestos inhiben específicamente la actividad de Cot/tpl-2 y pueden ser utilizados *in vivo*.

### 5. **Regulación de la expresión de proteínas**

El conjunto de proteínas codificadas por el genoma, denominado proteoma, determina el fenotipo y la plasticidad celular en respuesta a señales extracelulares. Los niveles de expresión de las proteínas no sólo dependen de la tasa de transcripción de los genes, sino también de otros controles adicionales como localización del mRNA, estabilidad del transcrito, regulación de la traducción de mensajeros y degradación de proteínas. Además, tanto la actividad como la función de las proteínas pueden ser alteradas por modificaciones post-traduccionales como metilación, glicosilación, fosforilación y rotura proteolítica (42).

#### 5.1. Regulación de la estabilidad del mRNA

Muchos mRNAs tienen vidas medias muy cortas debido a elementos ricos en secuencias AU (AREs) localizados en la región 3' no traducida, que desestabilizan los transcritos. Las proteínas que interaccionan con los sitios AREs desempeñan un papel esencial en la degradación del mRNA. Varias vías de señalización intracelular regulan la función de las proteínas de unión a AREs, incluidas las MAPKs p38 $\alpha$ , JNK1/2 y Erk1/2 (2, 115). Además, se ha demostrado que la expresión de microRNAs no codificantes también regula la estabilidad de los mensajeros (51).

### 5.2. Regulación de la biosíntesis de proteínas

Debido a que los niveles de mRNA en las células no correlacionan siempre con los niveles de proteína y que es el proteoma el que determina el fenotipo celular, en los últimos años ha adquirido mayor relevancia el estudio de la regulación de la maquinaria traduccional además de los estudios clásicos de regulación transcripcional y post-traduccional. El control traduccional confiere a la célula un estricto control de la síntesis de productos proteicos críticos, habiéndose demostrado su importancia durante el desarrollo embrionario, en la regulación de la respuesta inmune tras la infección por patógenos y en el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Su desregulación está implicada en el desarrollo de muchas enfermedades como por ejemplo sepsis, cáncer y diabetes (42, 70).

#### 5.2.1. Iniciación de la traducción

La biosíntesis de proteínas es un proceso complejo que consiste en tres fases: iniciación, elongación y terminación. El paso limitante en el control de la traducción de proteínas en eucariotas es la iniciación. Durante la iniciación de la traducción las subunidades pequeñas del ribosoma son reclutadas al mRNA y se posicionan en el codón de inicio. A continuación, se une el ribosoma completo y se inicia la formación de polipéptidos. Existen dos mecanismos de iniciación de la traducción: Cap-dependiente e IRES-dependiente (64, 80).

- Regulación de la iniciación de la traducción Cap-dependiente

La inmensa mayoría de los mRNAs eucarióticos contienen una estructura en el extremo 5' del mRNA necesaria para que se inicie la traducción de proteínas denominada 5' Cap  $m^7GpppN$ : donde  $m^7G$  es metilguanosina y N el primer nucleótido. Esta estructura se añade durante la transcripción del mRNA y desempeña un papel esencial en el ciclo de vida del mRNA, protegiéndolo de exonucleasas y promoviendo la transcripción, poliadenilación, procesamiento alternativo y exportación nuclear del mRNA; siendo necesaria para la expresión eficiente de genes y la viabilidad celular (122).

Para la iniciación de la traducción de mRNAs es necesario que el factor de iniciación de la traducción eucariota eIF4E se una a la estructura Cap y subsecuentemente forme el complejo activo de iniciación de la traducción eucariota eIF4F. El complejo eIF4F recluta a la subunidad pequeña del ribosoma 40S al extremo 5' del mRNA. Además, este complejo tiene actividad helicasa que elimina las estructuras secundarias presentes en la región no traducida 5' (UTR) de algunos mRNAs, permitiendo un escaneo eficiente del ribosoma en dirección 5'-3' hasta

encontrar el codón de inicio AUG. La proteína inhibidora 4E-BP1 forma un complejo inhibitorio con eIF4E impidiendo que se forme el complejo eIF4F y por tanto, inhibiendo la traducción. Señales extracelulares que activan la traducción, inducen la fosforilación e inhibición de 4E-BP1, que se disocia de eIF4E, activándose así la biosíntesis de proteínas (122).

Una vez que la subunidad pequeña del ribosoma encuentra el codón de inicio, se une la subunidad grande del ribosoma 60S para formar el complejo de elongación, el ribosoma 80S. La tasa de traducción de mRNA está determinada por el número de ribosomas asociados a un transcrito. De este modo, los mensajeros son inactivos cuando están secuestrados en partículas de mensajeros ribonucleoproteicos (mRNP) o sólo están unidos a un ribosoma (monosoma) y activos cuando están unidos a múltiples ribosomas formando polisomas (129).

- Regulación de la iniciación de la traducción IRES-dependiente

Existe un mecanismo alternativo de iniciación de la traducción en células eucariotas que es independiente del reconocimiento del extremo 5' del mRNA y permite a la subunidad pequeña del ribosoma 40S ser reclutada directamente cerca del codón de inicio. Las secuencias de mRNA que se requieren para el reclutamiento de la subunidades 40S se denominan sitios internos de entrada del ribosoma o IRES. Muchos de los mRNAs que contienen secuencias IRES son mRNAs con secuencias 5'UTRs largas, con estructuras secundarias ricas en GC y con varios codones de inicio de la traducción, donde el escaneo Cap-dependiente se ve comprometido (64).

#### 5.2.2. Activación de la biosíntesis de proteínas Cap-dependiente en respuesta a estímulos extracelulares

Las células necesitan controlar en todo momento un nivel adecuado y preciso de las proteínas que las componen. Además, el proceso de la biosíntesis de proteínas consume gran cantidad de material celular y energía, por lo que para mantener la homeostasis celular es necesario una regulación exhaustiva de la tasa de síntesis de proteínas (80).

El principal integrador de las distintas vías de señalización que regulan la traducción en respuesta a señales extracelulares es el complejo mTOR, conservado desde levaduras a humanos. Existen dos complejos funcionalmente distintos de mTOR dependiendo de las proteínas con las que interaccione: mTORC1 y mTORC2, que se detallan a continuación (137).



- Activación y funciones fisiológicas de mTORC1

El complejo mTORC1 está compuesto por las proteínas mTOR, Raptor, mLST8, PRAS40 y Deptor. Este complejo regula la traducción de proteínas, el crecimiento celular, la proliferación y la supervivencia y responde a hormonas, factores de crecimiento, nutrientes, estrés y señales energéticas. mTORC1 es diana del macrólido bacteriano rapamicina (137).

La actividad quinasas de mTORC1 está controlada negativamente por el heterodímero supresor de tumores TSC1-TSC2 conservado de *Drosophila* a mamíferos. La activación de PI3K-PDK1 en respuesta a multitud de señales intracelulares induce la fosforilación de Akt en el bucle de activación de esta quinasas, el residuo T308. Subsecuentemente, Akt fosforila a TSC2 inhibiendo al complejo TSC2-TSC1 y permitiendo por tanto la activación de mTORC1 (80).

La vía de señalización de Erk1/2 también fosforila e inhibe a TSC2 directamente, e indirectamente a través de la activación de la quinasas RSK (p90 RSK), induciendo la activación del complejo mTORC1 (3, 80).

Además, las MAP quinasas p38 $\alpha$  y Erk1/2 activan a MNK que fosforila a la proteína de unión a Cap eIF4E, aunque la importancia de esta fosforilación, aún no está establecida (122, 124).

Las principales dianas de mTORC1 son componentes de la maquinaria de traducción, incluidas la proteína inhibidora 4E-BP1 y la proteína S6 quinasas (p70 S6K1 o S6K1). La fosforilación de 4E-BP1 por mTORC1 da lugar a la disociación del complejo 4E-BP1-eIF4E, permitiendo la formación del complejo de iniciación de la traducción eIF4F (102). La quinasas S6K1 fosforila a la proteína S6 de la subunidad pequeña del ribosoma 40S (102). Esta fosforilación está relacionada con un ensamblaje más eficiente del ribosoma con el complejo de iniciación de la traducción (108). S6K1 también fosforila a la quinasas eEF2K inhibiéndola. eEF2K fosforila e inhibe al factor de elongación eEF2. eEF2 media el paso de translocación en la elongación de la cadena peptídica donde el ribosoma migra a lo largo del mRNA (102). Estas dos dianas de S6K1 pueden ser fosforiladas a su vez por RSK (3) (Figura 7A).

mTORC1 también activa la traducción de una población específica de mRNAs imprescindibles para la capacidad de síntesis de proteínas celulares, denominados 5' TOP mRNAs. A diferencia de la mayoría de mRNA celulares, los transcritos de todas las proteínas ribosomales conocidas hasta ahora así como otros componentes de la maquinaria traduccional, principalmente factores de elongación, contienen una citosina



invariable en el primer residuo después de la estructura Cap seguida de 5-14 pirimidinas dependiendo del transcrito. Esta característica les confiere un mecanismo de control de su traducción específico. El número de transcritos individuales que pertenecen a la familia de los 5' TOP mRNA es pequeño, pero su abundancia en las células puede representar el 20% del total del mRNA celular (85).

Existe un amplio número de patologías humanas, desde enfermedades metabólicas a cáncer, que se han asociado a una desregulación de la activación de mTORC1. De hecho, existen mecanismos de retroalimentación negativa que inhiben a este complejo una vez activado, como la inhibición de Akt por el sustrato directo de mTORC1, S6K1 (80).

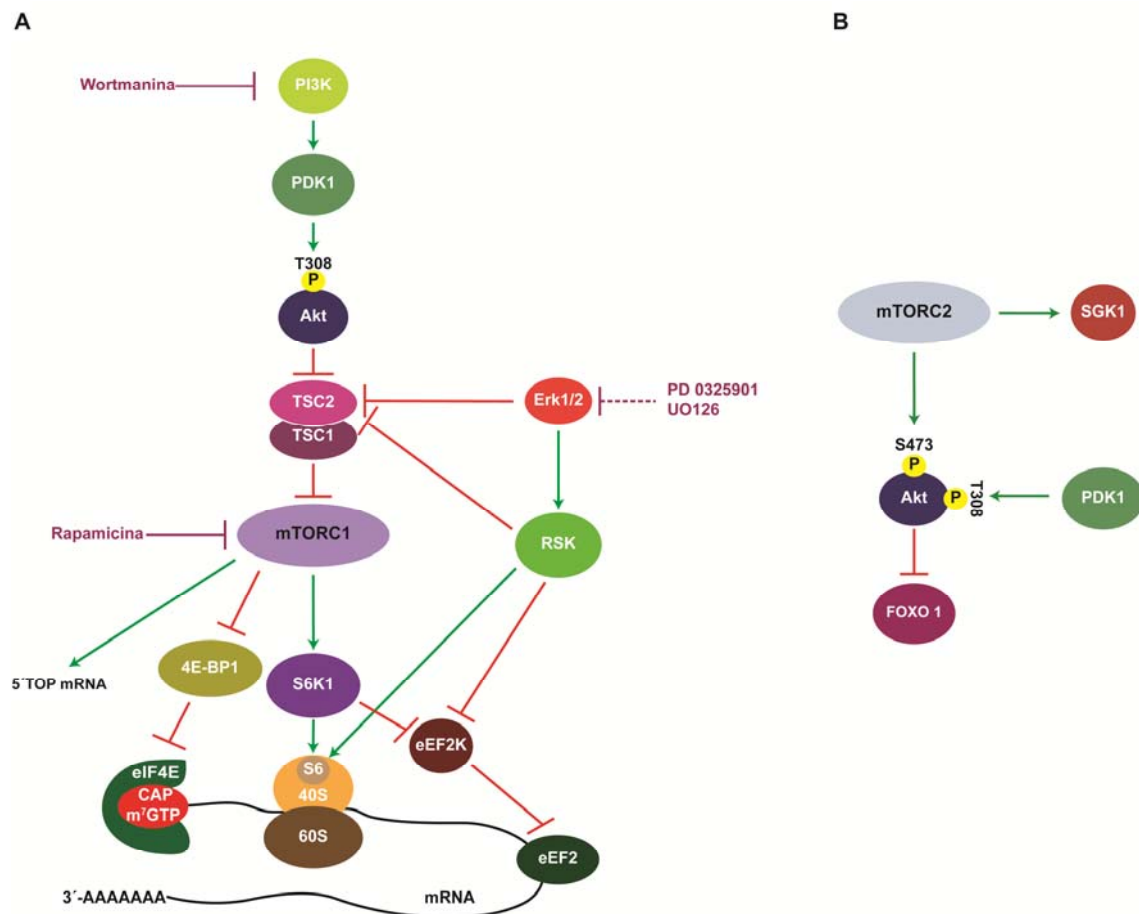


Figura 7. Señalización mediada por el complejo mTORC1 (A) y mTORC2 (B).

- Activación y funciones fisiológicas de mTORC2

El complejo mTORC2 está compuesto por las proteínas mTOR, Rictor, mSIN1, Protor-1, mLST8 y Deptor. A diferencia de mTORC1, mTORC2 es insensible a condiciones energéticas o a la disponibilidad de nutrientes, y responde a hormonas y factores de crecimiento, regulando el citoesqueleto de actina y la supervivencia celular. La actividad intrínseca de mTORC2 no es sensible a rapamicina, pero una larga incubación con rapamicina impide la formación del complejo inhibiendo su actividad (137).

mTORC2 induce la fosforilación de SGK1 y de Akt en S473. La fosforilación de Akt en S473 es posterior a la producida por PDK1 en T308, situada en el bucle de activación de esta quinasa. Ambas fosforilaciones son necesarias para la completa activación de Akt. La activación de Akt por PDK1 es suficiente para la activación de algunos sustratos como TSC2. Sin embargo, se requiere su activación completa por mTORC2 para la fosforilación de otros sustratos como el factor de transcripción FOXO1 (41, 49) (Figura 7B).

### 5.3. Relevancia del control de la expresión de proteínas en el sistema inmune

En los últimos años se ha comenzado a establecer la importancia del papel fisiológico de la regulación de la expresión de proteínas a nivel post-transcripcional en respuesta a estimulación extracelular durante la activación de las células del sistema inmune.

Por un lado, los niveles de expresión de mRNAs de mediadores inflamatorios vienen dados no sólo por la regulación a nivel de transcripción del gen, sino también por la regulación de la estabilidad del mensajero. La región 3' de muchos mRNAs de citoquinas y quimioquinas tienen secuencias ARES (2). La activación de las MAP quinasas tras la estimulación de los TLRs o por citoquinas como TNF $\alpha$ , es esencial para la estabilización e iniciación de la traducción de estos mRNAs (53, 62, 105, 130). Además, recientemente se ha demostrado que algunos microRNAs regulan la estabilidad de citoquinas en respuesta a la estimulación con LPS (15).

Por otro lado, se ha comprobado que las células inmunes son capaces de sintetizar mediadores inflamatorios altamente regulados tras la estimulación extracelular, mediante el control de la traducción por mTORC1, regulando así el microambiente inflamatorio (83, 121, 133).

The background of the entire page is a dense, repeating pattern of microscopic images, likely of cells or microorganisms, rendered in a light gray, semi-transparent style. The pattern consists of various shapes, including circular and oval structures with internal details, and elongated, branching forms, creating a complex, organic texture.

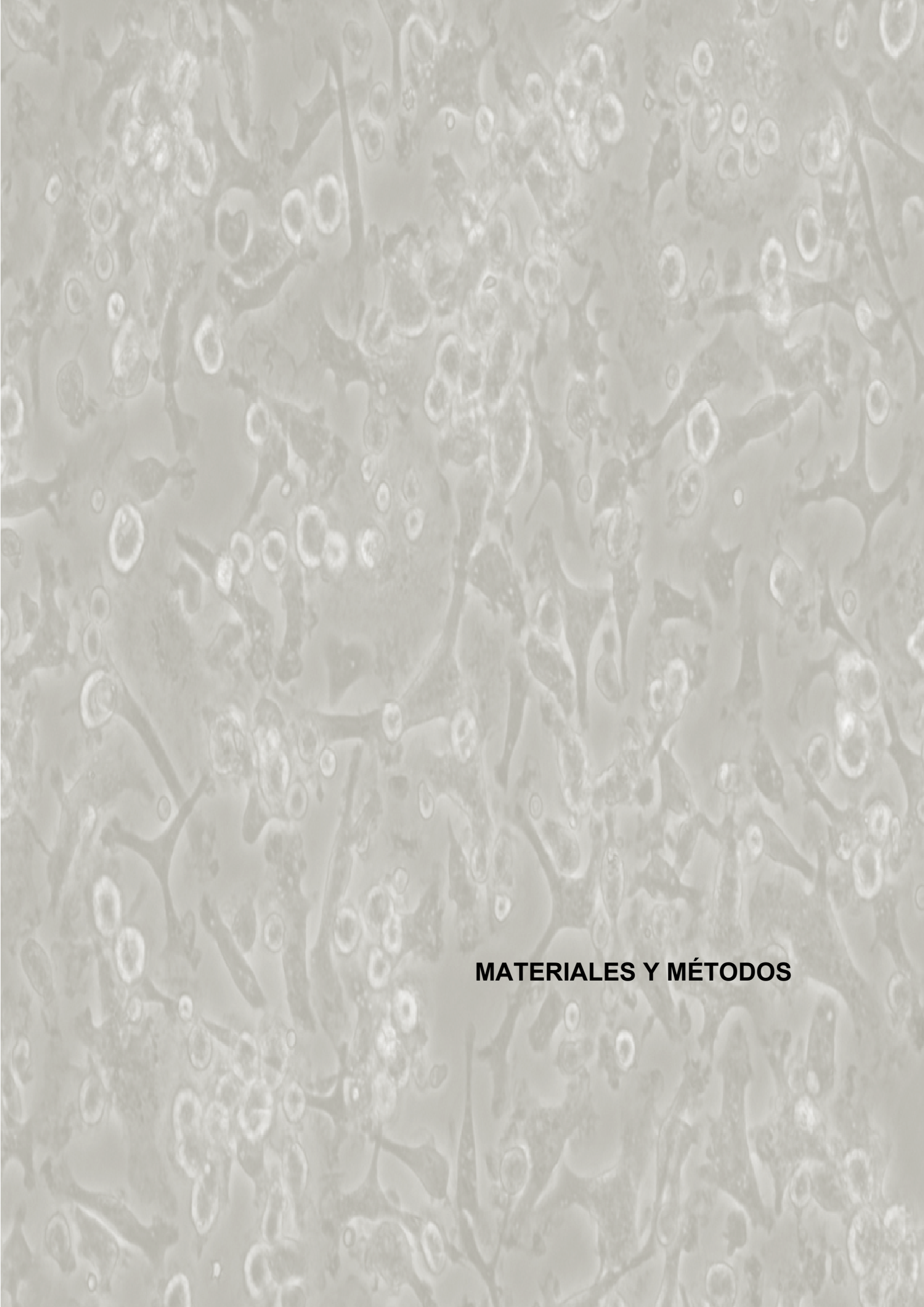
## **OBJETIVOS**



Los objetivos específicos de esta tesis doctoral han sido los siguientes:

1. Determinar las vías de señalización intracelulares controladas por Cot/tpl-2 en macrófagos tras la estimulación de los TLRs.
2. Analizar la implicación de Cot/tpl-2 en la expresión de proteínas a nivel post-transcripcional en macrófagos en respuesta a LPS.
3. Estudiar el papel de Cot/tpl-2 en el control del estado de activación de los macrófagos tras la estimulación con LPS.



The background of the page is a dense, grayscale microscopic image. It features numerous circular and oval structures, likely cells or microorganisms, with varying internal textures and some prominent nuclei. The overall appearance is that of a histological or microbiological slide.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**







## 1. Materiales

### 1.1. Anticuerpos

#### 1.1.1. Anticuerpos primarios utilizados para Western blot

Anticuerpo	Casa Comercial	Anticuerpo	Casa Comercial
<b>NOS2</b>	Santa Cruz	<b>FOXO1</b>	Cell Signaling
<b>IRF1</b>	Santa Cruz	<b>P-S939 TSC2</b>	Cell Signaling
<b>COX2</b>	Santa Cruz	<b>P-S1798 TSC2</b>	Pierce Thermo Scientific
<b>Cot/tpl-2</b>	Santa Cruz	<b>TSC2</b>	Cell Signaling
<b>P-T185/T187 Erk1 y P-T202/Y204 Erk2</b>	Cell Signaling	<b>P-T573 RSK</b>	Cell Signaling
<b>Erk2</b>	Santa Cruz	<b>RSK</b>	Santa Cruz
<b>P-T180/Y182 p38<math>\alpha</math></b>	Cell Signaling	<b>P-S65 4E-BP1</b>	Cell Signaling
<b>P-T183/Y185 JNK1/2</b>	Promega	<b>4E-BP1</b>	Cell Signaling
<b>JNK1</b>	Santa Cruz	<b>P-T389 S6K1</b>	Santa Cruz
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b>	Cell Signaling	<b>S6K1</b>	Santa Cruz
<b>P-T701 STAT1<math>\alpha/\beta</math></b>	Cell Signaling	<b>P-S235/236 S6</b>	Cell Signaling
<b>STAT1<math>\alpha/\beta</math></b>	Cell Signaling	<b>S6</b>	Cell Signaling
<b>P-S473 Akt</b>	Cell Signaling	<b>P-S366 eEF2K</b>	Cell Signaling
<b>P-T308 Akt</b>	Cell Signaling	<b>eEF2K</b>	Cell Signaling
<b>Akt</b>	Cell Signaling	<b>P-S209 eIF4E</b>	Cell Signaling
<b>P-S422 SGK1</b>	Santa Cruz	<b>eIF4E</b>	Cell Signaling
<b>P-T24 FOXO1</b>	Cell Signaling		

#### 1.1.2. Anticuerpos secundarios utilizados para Western blot

Anticuerpo	Casa Comercial
<b>Anti-IgG de conejo</b>	Cell Signaling
<b>Anti-IgG de ratón</b>	Amersham Biosciences
<b>Anti- IgG de cabra</b>	DAKO

### 1.1.3. Anticuerpos acoplados a fluoróforos utilizados para citometría de flujo

Anticuerpo	Fluoróforo	Casa Comercial
<b>Anti-CD16/CD32 de ratón (bloqueo de receptores Fc)</b>		BD Pharmingen
<b>Anti-IgG2b de rata (isotipo control)</b>	FITC	eBioscience
<b>Anti-IgG2b de rata (isotipo control)</b>	PE	eBioscience
<b>Anti-IgG2b de rata (isotipo control)</b>	PE-Cy7	eBioscience
<b>Anti-F4/80 de ratón</b>	PE-Cy7	eBioscience
<b>Anti-Gr1 (Ly6C/G) de ratón</b>	FITC	eBioscience
<b>Anti-CD19 de ratón</b>	PE	BD Pharmingen
<b>Anti-CD3 de ratón</b>	FITC	BD Pharmingen
<b>Anti-CD4 de ratón</b>	FITC	Beckman Coulter
<b>Anti-CD8 de ratón</b>	PE	Beckman Coulter
<b>Anti-CD80 de ratón</b>	PE	BD Pharmingen
<b>Anti-CD86 de ratón</b>	PE	BD Pharmingen
<b>Anti-MHC-II de ratón</b>	FITC	eBioscience
<b>Anti-CD11a de ratón</b>	PE	BD Pharmingen
<b>Anti-CD11b de ratón</b>	PE	eBioscience
<b>Anti-CD11c de ratón</b>	PE	eBioscience

### 1.1.4. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia

Anticuerpo	Fluoróforo	Casa Comercial
<b>IRF3 (Anticuerpo primario)</b>		Santa Cruz
<b>IgG anti-conejo (Anticuerpo secundario)</b>	Alexa Fluor 488	Molecular Probes, Leiden, The Netherlands

## 1.2. Oligos utilizados para RT-PCR

### 1.2.1. Oligos Taqman

- NOS2, IRF1, IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-12 p40, CCL-5,  $\beta$ -Actina, I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , SOCS1, SOCS3, TNF $\alpha$ , IL-6, KC (CXCL-1), y r18S.

## 1.2.2. Oligos Sybr green

	Oligo	Secuencia
<b>IP-10</b> <b>(CXCL-10)</b>	Directo	5' GCT GGG TCT GAG TGG GAC T 3'
	Reverso	5' CCC TAT GGC CCT CAT TCT C 3'
<b>eEF1<math>\alpha</math></b>	Directo	5' ACA CGT AGA TTC CGG CAA GT 3'
	Reverso	5' AGG AGC CCT TTC CCA TCT C 3'
<b>EF2</b>	Directo	5' GTT GAC GTC AGC GGT CTC TT 3'
	Reverso	5' GCA CGG ATC TGA TCT ACT GTG A 3'
<b>r18S</b>	Directo	5' CCA GTA AGT GCG GGT CAT AAG C 3'
	Reverso	5' CCT CAC TAA ACC ATC CAA TCG G 3'

1.3. Cultivo celular

Producto	Casa Comercial	Producto	Casa Comercial
<b>RPMI 1640</b>	Sigma	<b>Placas de Petri</b>	Falcon
<b>DMEM-HEPES</b>	Sigma	<b>Placas y botellas de cultivo celular</b>	Falcon
<b>FBS (Suero Fetal Bovino)</b>	Sigma	<b>Rascadores</b>	Costar
<b>Gentamicina</b>	Normon	<b>Fungizona</b> (Anfotericina B)	Sigma

1.4. Estímulos e inhibidores

Producto	Casa Comercial	Producto	Casa Comercial
<b>Tioglicolato</b>	Difco	<b>IL-10</b>	PeproTech
<b>LPS</b> ( <i>Salmonella typhimurium</i> )	Sigma L726	<b>Wortmanina</b>	Calbiochem
<b>Zymosan</b> ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	Invivogen	<b>PD 0325901</b>	Prof. Philip Cohen (Dundee)
<b>Poly I:C</b> (análogo sintético de dsRNA)	Invivogen	<b>UO 126</b>	Tocris
<b>IFN<math>\beta</math></b>	PeproTech	<b>Rapamicina</b>	Dr. Víctor Calvo (Madrid)
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	PeproTech	<b>Actinomicina D</b>	Sigma-Aldrich

1.5. Tampones y soluciones

Tampones/soluciones	Composición
<b>TBS*</b>	Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM
<b>TTBS*</b>	TBS, Tween 20 0.01% (Sigma-Aldrich)
<b>PBS*</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 43 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.4 M, NaCl 137 mM, KCl 27 mM
<b>MOPS 1X</b>	MOPS 20 mM pH 7.2 mM, acetato sódico 2 mM, EDTA 1 mM pH 8
<b>SSC 20X</b>	NaCl 3 M, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Na <sub>3</sub> 300 mM
<b>Tampón de carga proteínas*</b>	Tris-HCl 250 mM pH 6.8, SDS 10%, glicerol 25%, azul de bromofenol 0.04%
<b>Tampón de carga RNA</b>	MOPS 1X, formamida 50%, formaldehído 37%, dye solution 1X (Life Sciences), bromuro de etidio 0.5%
<b>ECL</b>	Luminol 1.25 mM; p-cumárico 0.275 mM, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.009%

\* Estos medios, junto con los medios RPMI y DMEM-HEPES fueron suministrados por el Servicio Técnico de Preparación de Medios de Cultivo del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”.

1.6. Otros compuestos utilizados

Compuesto	Casa comercial	Compuesto	Casa comercial
<b>NEDA</b>	Sigma-Aldrich	<b>p-cumárico</b>	Sigma-Aldrich
<b>Ácido sulfanílico</b>	Panreac	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Sigma-Aldrich
<b>Bradford</b>	Bio-Rad	<b>Películas de rayos X</b>	Konica Minolta
<b>Rojo Ponceau</b>	Carlo Erba	<b>Kit de extracción de mRNA por columnas</b>	Quiagen
<b>Leche desnatada en polvo</b>	La Asturiana	<b>RNase OUT</b>	Invitrogen
<b>BSA</b>	Sigma-Aldrich	<b>Membrana de nailon</b>	Life Sciences
<b>Membrana de PVDF</b>	Biotrace	<b>m<sup>7</sup>GTP sefarosa</b>	Amersham Biosciences
<b>Luminol</b>	Sigma-Aldrich	<b>Vectashield</b>	Vector labs

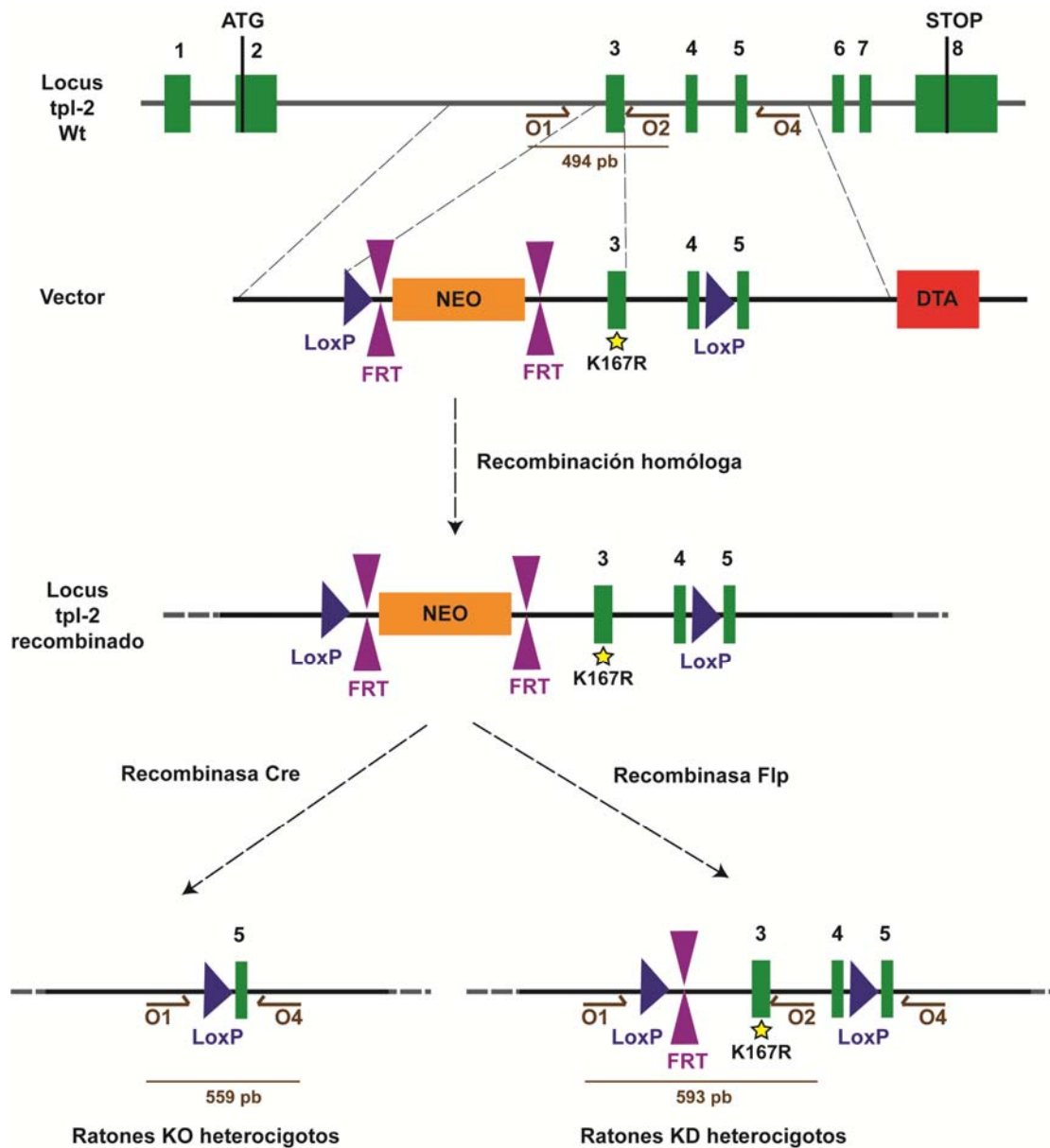
## 2. Métodos

### 2.1. Animales y estabulación

Se han utilizado ratones de la cepa C57BL/6J macho y hembras de 2-3 meses de edad. Los animales se mantuvieron en habitaciones con temperatura constante ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), humedad ambiental de 40-70%, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y alimentación *ad-libitum* con dieta peletizada (SAFE diets R04). La manipulación de los ratones se realizó de acuerdo con la normativa de la Comunidad Europea sobre el uso de animales de experimentación (86/609/EEC) y los protocolos experimentales se aprobaron por el CEEA del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

### 2.2. Generación de los ratones deficientes en Cot/tpl-2 (Cot/tpl-2 KO) y ratones sin actividad quinasa de Cot/tpl-2 (Cot/tpl-2 KD) y genotipado

Para analizar las funciones fisiológicas de Cot/tpl-2 se generaron ratones que no expresan la proteína Cot/tpl-2 mediante la delección de los exones 2 y 3 (ratones Cot/tpl-2 KO) y ratones que expresan la proteína Cot/tpl-2 pero sin actividad quinasa mediante la sustitución de la lisina 167, responsable de unión al ATP, por arginina (K167R) (ratones Cot/tpl-2 KD). Para ello, en primer lugar se realizó un análisis informático del gen *tpl-2* y se diseñó un vector que contiene secuencias de homología con el gen *tpl-2* con la mutación K167R en el exón 3, flanqueado por secuencias que son reconocidas por la recombinasa Cre (LoxP), un gen de selección positiva (gen de resistencia a neomicina) flanqueado por secuencias que son reconocidas por la recombinasa Flp (FRT) y un gen de selección negativa (gen toxina Difteria, DTA). A continuación, esta construcción se transfectó en células madre embrionarias ES 129Sv/Pas y las células transfectadas se seleccionaron con neomicina. Además, las células en las que se había insertado la construcción por inserción al azar y no por recombinación homóloga, morían al incorporar el gen DTA. Las células ES seleccionadas se genotiparon y en las que había ocurrido la recombinación homóloga se inyectaron en blastocitos de ratón C57BL/6J. Los ratones quimera F1 se cruzaron con ratones C57BL/6J portadores de la recombinasa Cre, eliminándose los exones 3 y 4 y el gen de resistencia a Neomicina generándose los ratones Cot/tpl-2 KO, o con ratones C57BL/6J portadores de la recombinasa Flp eliminándose el gen de resistencia a neomicina y generándose los ratones Cot/tpl-2 KD (Figura 1). Los ratones Cot/tpl-2 KO y Cot/tpl-2 KD fueron generados por la empresa Genoway. Estos ratones con fondo mixto 129Sv/Pas y C57BL/6J se pasaron a un fondo genético homogéneo C57BL/6J mediante retrocruzamiento acelerado.



**Figura 1. Esquema representativo de la generación de ratones *Cot/tpl-2* KO y *Cot/tpl-2* KD y de los oligos utilizados para el genotipado.**

El mantenimiento de la colonia se realizó mediante cruces entre ratones heterocigotos (*Cot/tpl-2* KO +/- x *Cot/tpl-2* KO +/- y *Cot/tpl-2* KD +/- x *Cot/tpl-2* KD +/-). Para el genotipado de los ratones se digirió 0.5 cm de cola de cada ratón con proteinasa K durante 18 horas a 55°C y el DNA se extrajo con columnas de Quiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, el DNA genómico se amplificó mediante PCR con el oligo directo O1 (5' CTA GGC GGG TGT TTT ACC ACT GAG C 3') y con el oligo reverso O2 (5' GAC ACA AGT TCC TGG TCC AAC CTG C 3') y las siguientes condiciones: 5 minutos a 94°C, 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 63°C y 1 minuto a 72°C, y 7 minutos a 72°C (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler). Los ratones Wt generan un producto de PCR de 494 pb, los

ratones Cot/tpl-2 KD generan un producto de PCR de 593 pb y los ratones Cot/tpl-2 KO no generan ningún producto de PCR (Figura 1). Para comprobar el genotipo de los ratones Cot/tpl-2 KO, se utilizaron el oligo directo O1 y el oligo reverso O4 (5' TTG TTG CCA CAT GGC TCA AAA T 3') en las condiciones de PCR descritas anteriormente. Los ratones Cot/tpl-2 KO generan un producto de PCR de 559 pb (Figura 1).

### 2.3. Cultivo de macrófagos peritoneales

Para la obtención de macrófagos peritoneales se inyectaron 3 ml de tioglicolato al 3% (p/v) intraperitonealmente a 4 ratones macho salvajes (Wt) y Cot/tpl-2 KO de 2-3 meses. A los 4 días de la inyección, los ratones se sacrificaron con CO<sub>2</sub> para no dañar ningún órgano interno y las células de la cavidad peritoneal se obtuvieron mediante un lavado con 10 ml de PBS. Las células obtenidas se filtraron con una gasa estéril para eliminar restos y grasa, se centrifugaron a 1500 rpm y se lavaron 2 veces con PBS. A continuación, se trataron con solución hipotónica 1 (NH<sub>4</sub>Cl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.2) durante 3 minutos para eliminar los eritrocitos y la reacción se paró con medio RPMI. Posteriormente, las células se centrifugaron, se resuspendieron en medio RPMI con 10% de FBS y antibióticos (gentamicina 80 µg/ml y fungizona 1.25 µg/ml) y se sembraron en placas para cultivo celular a la densidad adecuada según cada experimento. A las 24 horas siguientes, las placas se lavaron con PBS para eliminar las células que no se habían adherido a la placa (los linfocitos) y las células se deplecionaron con RPMI con 0.1% de FBS y antibióticos. A las 24 horas siguientes, las células se estimularon durante los tiempos indicados para cada experimento.

### 2.4. Cultivo de macrófagos derivados de la médula ósea

#### 2.4.1. Diferenciación de células de la médula ósea a macrófagos

Las células de la médula ósea de la tibia y del fémur de ratones Wt, Cot/tpl-2 KO y Cot/tpl-2 KD machos o hembras de 2-3 meses se extrajeron lavando la cavidad de los huesos con RPMI con 10% de FBS y antibióticos utilizando una jeringa acoplada a una aguja de calibre 25 G. Las células obtenidas se filtraron con una gasa estéril para eliminar las posibles astillas de hueso y se lavaron 2 veces con RPMI con 10% de FBS y antibióticos. Después, se sembraron a una densidad de  $10 \times 10^6$  en 10 ml de RPMI con 10% de FBS y antibióticos más 30% de medio condicionado de fibroblastos L929, que contiene los factores de diferenciación de los macrófagos M-CSF y GM-CSF. Se utilizaron placas p100 de Petri no tratadas para cultivo celular para que al final de la diferenciación las células se pudiesen levantar sin dañarlas. A los 3 días, se les añadió medio fresco RPMI con 10% de FBS y antibióticos más 30% de

medio condicionado de fibroblastos L929. A los 7 días, las células diferenciadas se levantaron con rascadores de Costar. Se lavaron 2 veces con RPMI con 0.1% de FBS y se sembraron en placas para cultivo celular en RPMI con 0.1% de FBS y antibióticos según la densidad adecuada para cada experimento. A las 24 horas se estimularon durante los periodos de tiempo indicados para cada experimento.

### 2.4.2. Generación de medio condicionado de fibroblastos L929

Se cultivaron fibroblastos L929 en un pase inferior a 12 en medio DMEM-HEPES con 10% de FBS y antibióticos en botellas para cultivo celular T175. Cuando alcanzaron el 100% de confluencia, el medio se cambió por 30 ml de medio fresco DMEM-HEPES con 10% de FBS y antibióticos. A la semana siguiente, este medio se recogió, se filtró con filtros de 0.2  $\mu$ m para eliminar las células levantadas y se congeló a -80°C. A estas células se les volvió a añadir 30 ml medio fresco DMEM-HEPES con 10% de FBS más antibióticos. A los 5 días, el medio se recogió, se filtró y se congeló a -80°C. Por último, se volvió a añadir 30 ml de medio fresco DMEM-HEPES con 10% de FBS más antibióticos y a los 5 días el medio se recogió, se filtró y se congeló a -80°C.

### 2.5. Análisis de marcadores de superficie por citometría de flujo

Para analizar las poblaciones de células obtenidas en el peritoneo tras la inyección intraperitoneal de tioglicolato y las poblaciones de macrófagos derivados de médula ósea tras su diferenciación de los ratones Wt y Cot/tpl-2 KO (apartados 2.3 y 2.4), se utilizaron 300.000 células por punto, se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron durante media hora con el anticuerpo de bloqueo CD16/CD32 (0.35  $\mu$ g/50  $\mu$ l) durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear los receptores Fc, evitando así uniones inespecíficas. A continuación, las células se lavaron con PBS y se incubaron con los anticuerpos contra los marcadores de superficie de interés unidos a fluoróforos (0.25  $\mu$ g/50  $\mu$ l) o con los isotipos controles de cada fluoróforo (0.25  $\mu$ g/50  $\mu$ l) como control negativo durante media hora a 7-8°C y en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con PBS, se resuspendieron en 300  $\mu$ l de PBS y se analizaron con el citómetro de flujo FC 500 MPL. Los porcentajes de expresión y la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de los distintos marcadores de superficie se calcularon con el programa CXP.

### 2.6. Medida de acumulación de óxido nítrico en macrófagos peritoneales

Para determinar la acumulación de óxido nítrico (NO) en el sobrenadante de macrófagos peritoneales, se recogió el sobrenadante de  $5 \times 10^6$  células/pocillo p6/2 ml.



Dado que el óxido nítrico (NO) se oxida a nitritos (ión estable), la determinación de la liberación de NO por los macrófagos se realizó midiendo la concentración de nitritos mediante el método de Griess (46). Se incubaron 200 µl del sobrenadante de las muestras con 20 µl de ácido sulfanílico 10 mM con 10% de HCl y 20 µl de NEDA 10 mM en placas p96 y se midió la absorbancia a 492 nm. La concentración de nitritos se calculó mediante una curva patrón realizada con nitrito sódico. Los nitritos se midieron por triplicado.

## 2.7. Inmunodetección de proteínas (Western blot)

### 2.7.1. Inmunodetección de proteínas en macrófagos

Para la inmunodetección de proteínas se utilizaron  $5 \times 10^6$  células/pocillo p6 de macrófagos peritoneales y BMDM. Tras retirar el medio de cultivo, las células se lavaron 2 veces con PBS en frío y se lisaron con 100 µl de solución de lisis a 4°C (HEPES 50 mM pH 7.4, glicerol 10%, NaCl 150 mM, NP-40 1%, EDTA 1mM, EGTA 1 mM, benzamidina 10 mM, PMSF 0.1 mM más una mini tableta completa de inhibidores de proteasas de Roche y 50 µl de mezcla de inhibidores de fosfatasa 1 y 2 de Sigma por 50 ml de solución de lisis). A continuación, el lisado se pasó 10 veces a través de una jeringa acoplada a una aguja de calibre 27 G para la completa lisis de los núcleos. Las células lisadas se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 minutos a 4° C. El sobrenadante, que contiene las proteínas, se cuantificó por el método de Bradford utilizando una curva patrón de BSA. Se añadió a los extractos solución de carga de proteína a concentración final 1X, se hirvieron 3 minutos a 99°C y se analizaron 40 µg de proteína en geles en gradiente del 4 al 20% de poliacrilamida SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas PVDF. Estas membranas se bloquearon con 5% de leche en TTBS durante 1 hora y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes con 5 % de BSA y 0.025 % de azida en TTBS, durante toda la noche a 4°C. A continuación, el exceso de anticuerpo se retiró con 3 lavados de TTBS de 5 minutos cada uno. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa con 1 % de leche en TTBS durante 1 hora a temperatura ambiente, para detectar la unión del anticuerpo primario al antígeno. Tras retirar el exceso de anticuerpo secundario mediante 3 lavados de TTBS y 1 final de TBS de 5 minutos cada uno, las membranas se incubaron con ECL y se revelaron utilizando películas de rayos X para detectar por quimioluminiscencia la unión del anticuerpo secundario al primario. La señal se cuantificó por densitometría con el programa informático Analysis (Olympus).

- El anticuerpo primario anti-P-S422 SGK1 se incubó también con 1 µg/µl de los péptidos EP1379 y EP2141, para eliminar la unión inespecífica de este anticuerpo con la proteína SGK1 sin fosforilar, como se ha descrito previamente (41).

### 2.7.2. Estimulación con LPS *in vivo* e inmunodetección de proteínas en hígado y pulmón

Se inyectó PBS (30 µl) o LPS (100 ng/30 µl) intraperitonealmente en ratones macho Wt y Cot/tpl-2 KO, y a las 8 horas los ratones se sacrificaron y se tomaron muestras de tejido de pulmón e hígado. A continuación, las muestras de tejido se cortaron en fragmentos pequeños y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido para su posterior análisis. Las muestras congeladas se homogenizaron con el politrón en solución de lisis de proteínas (apartado 2.7.1) y se analizaron mediante inmunodetección de proteínas por la técnica de Western blot, tal y como se ha descrito en el apartado anterior (2.7.1).

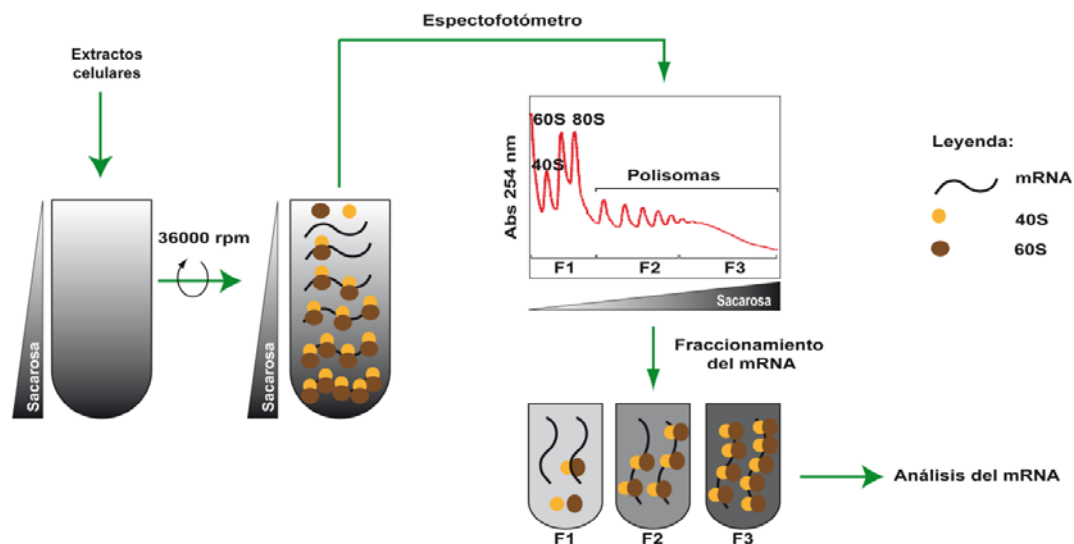
### 2.8 Extracción de RNA total

El RNA total de macrófagos BMDM ( $5 \times 10^6$ /pocillo p6) se extrajo con el kit de Qiagen “miRNAeasy mini kit” siguiendo las instrucciones del fabricante. Resumidamente, las células se lavaron 2 veces con PBS, se eliminó bien todo el PBS y se lisaron con 700 µl Trizol a 4°C. A continuación, el lisado se agitó con el vortex, se homogenizó pasándolo a través de una jeringa unida a una aguja de calibre 20 G y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente para disociar bien los complejos nucleoproteicos. Posteriormente, se añadieron 0.2 volúmenes de cloroformo, se agitó vigorosamente, se incubó 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 1200 g durante 15 minutos a 4°C. A la fase acuosa superior, se le añadieron 1.5 volúmenes de etanol, se mezcló y se añadió a las columnas de extracción del Kit. Por último, se realizaron 3 lavados con soluciones que contienen etanol para eliminar las impurezas y el RNA se eluyó con 60 µl de H<sub>2</sub>O libre de RNasas. La integridad del RNA obtenido se analizó mediante geles de agarosa al 1%. A continuación, el RNA se cuantificó y se determinó su pureza (ratios 260/280 y 260/230) en el nanodrop. Finalmente, se guardó a -80°C.

### 2.9 Análisis del perfil de polisomas y fraccionamiento del mRNA en gradiente de sacarosa

Macrófagos BMDM ( $10 \times 10^6$  células/placa p100) se lavaron 2 veces a 4°C con solución hipotónica 2 (Tris-HCl 5 mM pH 7.5, KCl 1.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM), se lisaron en solución de lisis 2 (solución hipotónica 2, Tritón X-100 0.5%, desoxicolato de sodio

0.5%, inhibidor de RNasas RNase OUT 120 U/ml y DTT 3 mM) y se centrifugaron a 6000 rpm durante 8 minutos a 4°C. Tras medir la concentración de proteínas, se añadió a los extractos heparina (1 mg/ml), que es un inhibidor inespecífico de RNasas. Posteriormente, se cargó la misma cantidad de proteína (500 µg) en un gradiente lineal de sacarosa (del 0.5 al 1.5 mM de sacarosa en Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y DTT 1 mM) y se centrifugaron en la centrífuga Beckman con rotor SW41 a 36000 rpm durante 2 horas a 4°C. A continuación, el gradiente se dividió en 3 fracciones siguiendo el perfil de absorbancia de RNA a 254 nm. La fracción 1 (F1) contiene las subunidades libres de ribosomas 40S y 60S, el mRNA que no está asociado a polisomas y el mRNA que está asociado sólo a un ribosoma 80S (monosoma). La fracción 2 (F2) contiene el RNA asociado a polisomas de bajo peso molecular y la fracción 3 (F3) contiene el mRNA asociado a polisomas de alto peso molecular (Figura 2).



**Figura 2. Esquema del fraccionamiento de mRNA asociado a polisomas.**

Una vez recolectadas las fracciones, se incubaron con proteinasa K (5 µM) en solución de proteinasa K (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, EDTA 50 mM, SDS 5%) durante 30 minutos a 37°C para disgregar las proteínas. El mRNA de las distintas fracciones se obtuvo mediante extracción con fenol/cloroformo. Se añadió a las fracciones el mismo volumen de fenol/cloroformo (en proporción 1:1). Se mezclaron bien, se agitaron con el vortex y se centrifugaron a 4000 rpm durante 30 minutos a 4°C. A la fase acuosa superior, se le añadió el mismo volumen de isopropanol, se mezcló bien y se incubó toda la noche a -20°C. A continuación, los extractos se centrifugaron en centrífuga Beckman con rotor SW41 a 10000 rpm durante 45 minutos a 4°C. Después, el precipitado obtenido se lavó con 75% de etanol (previamente guardado a -20°C) y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Este último paso se repitió 2 veces más, se

eliminó completamente el etanol, se dejó secar a temperatura ambiente 5 minutos y se resuspendió el precipitado en 50 µl de H<sub>2</sub>O libre de RNasas.

### 2.10 Detección de mRNA por Northern blot

Se separaron 10 µl del RNA obtenido de las distintas fracciones en un gel de agarosa del 1% en MOPS con 6% de formaldehído. Los geles se lavaron con agua para eliminar el paraformaldehído y el mRNA del gel se transfirió a una membrana de nailon cargada positivamente por capilaridad durante toda la noche con solución de transferencia SSC 20X. A continuación, el RNA se ligó a la membrana de forma estable con luz ultravioleta, la membrana se lavó con solución SSC 6X y se incubó con DNA desnaturalizado de esperma de salmón (100 µg/ml) en solución de hibridación (NaCl 1M, sulfato de dextrano 10%, SDS 1%) a 60°C durante 2 horas para bloquear las uniones inespecíficas con la membrana. La sonda complementaria con los primeros 57 nucleótidos codificantes del mRNA de eEF1α (57) se marcó con <sup>32</sup>γATP (Perkin Elmer) con la polinucleótido quinasa T4 (New England Biolab) y la sonda marcada se purificó con las columnas G50 (Amersham GE) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, la radioactividad se cuantificó, se añadió 1x10<sup>6</sup> cpm/ml de la sonda marcada a la solución de hibridación y las membranas se incubaron a 60°C durante toda la noche y se lavaron 3 veces rápidamente a temperatura ambiente y una hora a 60°C con la solución SSC 2X más 0,1% de SDS. Finalmente, las membranas se expusieron con una placa de Thyphoon y las bandas se cuantificaron mediante el programa Imagen quant.

### 2.11 RT-PCR cuantitativa

#### 2.11.1 RT-PCR cuantitativa de RNA total

Para analizar mRNAs específicos del mRNA total, el mRNA se extrajo como se ha indicado en el apartado 2.6 y se analizaron 100 ng/µl de RNA total con oligos Taqman o Sybr green. Los ensayos se hicieron por triplicado y se normalizaron los valores con el valor del r18S en cada ensayo.

#### 2.11.2 RT-PCR de mRNA fraccionado en gradiente de sacarosa

Para los análisis mediante RT-PCR del mRNA fraccionado en gradiente de sacarosa, en primer lugar se eliminaron los restos de heparina de las muestras, cómo se ha descrito previamente (26), para que no se inhibiese la reacción de RT-PCR. Resumidamente, el RNA se precipitó con LiCl 2 M a -20°C durante toda la noche, las muestras se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 4°C, el precipitado se lavó 2 veces con 70% de etanol (previamente guardado a -20°C), se eliminó el etanol, se

dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O libre de RNasas. A continuación, la expresión de 100 ng/µl de mRNA se analizó con oligos Taqman o Sybr green. La expresión relativa de cada muestra se normalizó multiplicando por la concentración de RNA total de cada muestra.

#### 2.12 Marcaje metabólico de proteínas con <sup>35</sup>S cisteína y metionina

Macrófagos BMDM (5x10<sup>6</sup> células/pocillo p6) se trataron o no con LPS (300 ng/ml) durante 3 horas. Una hora y media antes de recoger los extractos, las células se incubaron con medio DMEM libre de cisteína y metionina sin o con la misma concentración de LPS. En los últimos 30 minutos antes de recoger los extractos, las células se incubaron con DMEM libre de cisteína y metionina más 500 µCi de <sup>35</sup>S-cisteína/metionina (ICN, Irvine, CA) con o sin la misma concentración de LPS. Se separaron 40 µg de proteínas radioactivas en un gel de SDS-PAGE del 10% y el gel se reveló con películas de rayos X.

#### 2.13 Nucleofección de BMDM

Macrófagos BMDM (1x10<sup>6</sup> células/pocillo p12) se nucleofectaron con 1 µg del plásmido bicistrónico (pcDNA3rLuc-pollRESfLuc) amablemente cedido por el Dr. Alexey Benyumov, utilizando el kit de electroporación de Mirus y el sistema nucleofector de Amaxa Biosystems (programa Y-001) según las instrucciones del fabricante. Cuatro horas después de la transfección, las células se lavaron con RPMI con 0.5% de FBS más antibióticos y se incubaron en este medio durante toda la noche. A continuación, las células se estimularon o no con LPS (300 ng/ml) durante 3 horas y la actividad luciferasa de *Renilla* y de luciérnaga se determinó en los extractos celulares según las instrucciones del fabricante (Promega). Cada ensayo independiente se realizó por duplicado.

#### 2.14 Ensayos de precipitación con m<sup>7</sup>GTP-sefarosa

Macrófagos BMDM (10x10<sup>6</sup>/placa p100) se lavaron 2 veces con PBS en frío y se lisaron en la solución de lisis/unión (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, DTT 1 mM, NP-40 0.2%; RNase OUT 1U/ml de Invitrogen, benzamidina 10 mM, PMSF 1 mM más una tableta de inhibidores de proteasas de Roche) y se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se incubó 1 mg de proteína con 50 µl de m<sup>7</sup>GTP unido a sefarosa previamente pre-lavado con solución de lavado (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM). Las muestras estuvieron durante toda la noche en agitación en una noria en la cámara fría y se lavaron con 1 ml de la solución de lavado más DTT 1 mM. Este último paso se repitió 5 veces. A continuación, las

proteínas unidas a m<sup>7</sup>GTP-sefariosa se hirvieron en solución de carga de proteínas, se separaron en geles del 7-15% y la co-precipitación de las proteínas 4E-BP1 y eIF4E se determinó mediante Western blot.

### 2.15 Microscopía de fluorescencia

Macrófagos BMDM (250.000 células/pocillo p12) se plaquearon en cubres de cristal y se estimularon o no durante 1 y 2 horas con LPS. Posteriormente, las células se lavaron con PBS a 4°C, se fijaron con 4% de paraformaldehído en PBS durante 20 minutos, se lavaron 4 veces con PBS y se trataron con 0.1% de Triton X-100 en PBS durante 3 minutos para permeabilizarlas. Después, las células se lavaron 4 veces con PBS y se incubaron con solución de bloqueo (PBS más 10% de suero de caballo descomplementado por calor) durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda. A continuación, las células se incubaron con anticuerpo anti-IRF3 a una dilución 1:50 en solución de bloqueo durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda, se lavaron con PBS y se incubaron durante 45 minutos con el anticuerpo secundario anti-conejo marcado en Alexa Fluor 488 a una dilución 1:500 en solución de bloqueo. Finalmente, los cubres se montaron con el reactivo específico para inmunofluorescencia Vectashield con DAPI y se visualizó la fluorescencia con el microscopio confocal modelo Espectral Leica TCS SP5. El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el programa Image J.

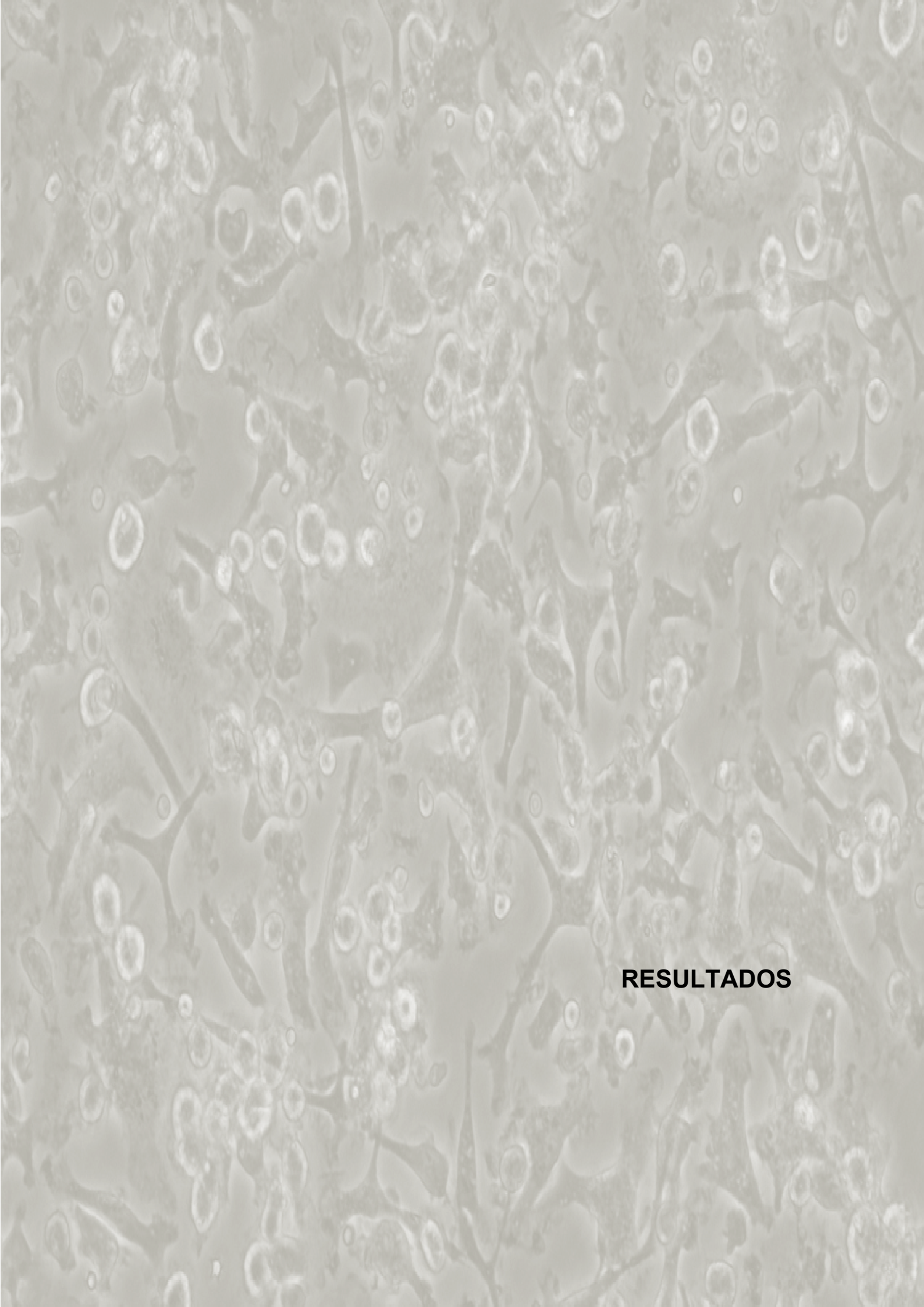
### 2.16 Análisis de citoquinas y quimioquinas mediante Luminex

El sobrenadante de macrófagos BMDM (5x10<sup>6</sup> células/pocillo p6 en 2 ml de medio) se recogió y se congeló inmediatamente a -80°C hasta su análisis. Se utilizaron 30 µl de la muestra para analizar las citoquinas y quimioquinas presentes en el sobrenadante con el Kit MILLIPLEX MAP de Millipore y la fluorescencia emitida se analizó en el Luminex 100 System siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta técnica se desarrolló en el servicio de citometría de flujo del Centro Nacional de Biotecnología de Madrid.

### 2.17 Análisis estadístico de los datos

Los resultados se expresaron como la media aritmética + o ± el error estándar de la media (SD). El análisis de la significancia estadística entre la media de los grupos de estudio Wt y Cot/tpl2 KO, se realizó mediante la prueba estadística t de student. Los valores se asumieron como estadísticamente significativos cuando el p-valor fue inferior a 0.05 (p<0.05 \*, p< 0.01 \*\*, p< 0.001 \*\*\*).



The background of the page is a dense, grayscale microscopic image. It features numerous circular and oval structures, likely cells or microorganisms, with varying internal textures and some prominent nuclei. The overall appearance is that of a histological or cytological slide.

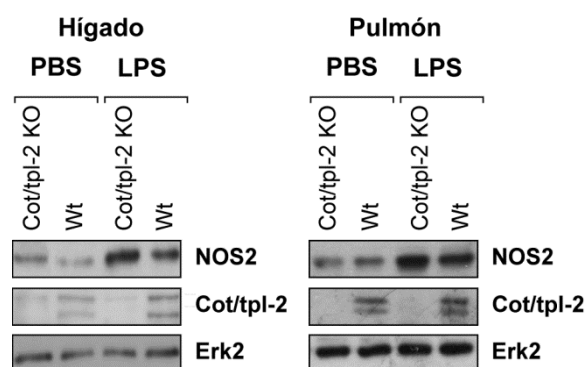
## **RESULTADOS**





## 1. Los macrófagos deficientes en Cot/tpl-2 presentan mayor expresión de NOS2 en respuesta a LPS

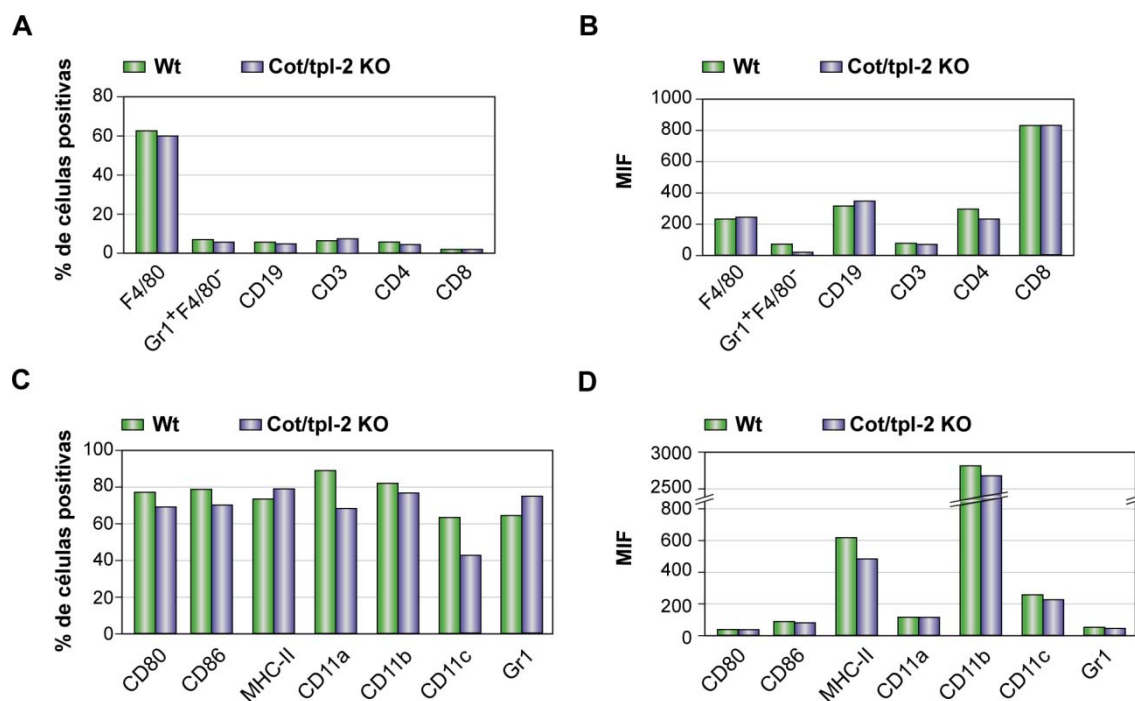
En esta Tesis Doctoral hemos analizado el papel de Cot/tpl-2 en la activación de los macrófagos en respuesta a la estimulación del receptor TLR4 por LPS, uno de los principales inductores de la activación clásica de los macrófagos o M1. La enzima óxido nítrico sintasa inducible (NOS2) es un marcador clásico de la activación M1 (76), por lo que decidimos estudiar en primer lugar la expresión de NOS2 en ratones salvajes (Wt) y en ratones deficientes en Cot/tpl-2 (Cot/tpl-2 KO) tras la inyección intraperitoneal de LPS *in vivo*. Nuestros resultados demuestran que los ratones Cot/tpl-2 KO presentan una mayor expresión de la enzima NOS2, tanto en hígado como en pulmón, 8 horas después de la inyección con LPS (Figura 1).



**Figura 1. Cot/tpl-2 reprime la expresión de NOS2 *in vivo*.** Ratones salvajes (Wt) y deficientes en Cot/tpl-2 (Cot/tpl-2 KO) se inyectaron intraperitonealmente con PBS o LPS (100 ng) y 8 horas después se determinó la expresión de NOS2 y Cot/tpl-2 en hígado y pulmón mediante Western blot. La expresión de Erk2 se determinó como control de carga. Se muestra el Western blot de un experimento representativo de los 4 experimentos independientes realizados.

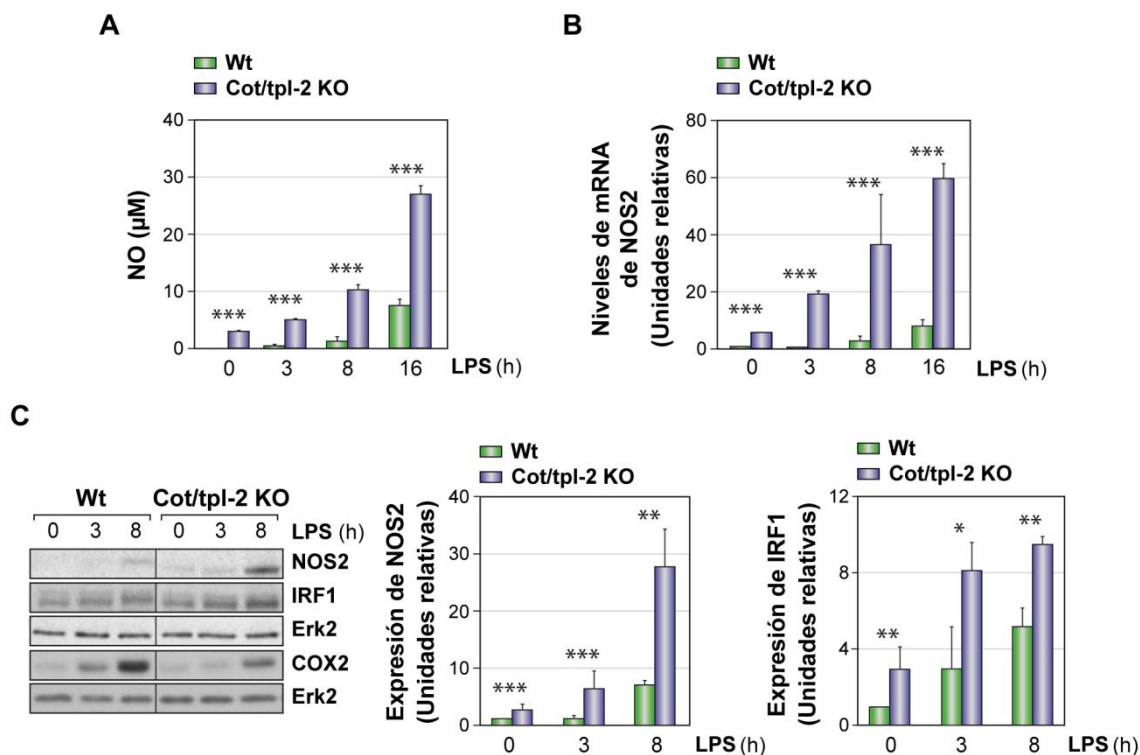
A continuación, decidimos analizar si Cot/tpl-2 también modula la expresión de NOS2 en macrófagos. Para ello, tras inyectar intraperitonealmente tioglicolato en ratones Wt y Cot/tpl-2 KO, obtuvimos macrófagos peritoneales y analizamos la población de células obtenidas mediante citometría de flujo. Los resultados demuestran que obtenemos el mismo porcentaje de células F4/80<sup>+</sup> (macrófagos) en los ratones Wt y en los ratones Cot/tpl-2 KO (Figura 2A). Asimismo, el porcentaje de granulocitos (F4/80<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>), de linfocitos B (CD19<sup>+</sup>) y de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>), tanto colaboradores (CD4<sup>+</sup>) como citotóxicos (CD8<sup>+</sup>), obtenidos tras el tratamiento mencionado, no varía en los ratones deficientes en Cot/tpl-2 en comparación con los ratones Wt (Figura 2A). La intensidad de fluorescencia de estos marcadores tampoco está modificada por la ausencia de Cot/tpl-2 (Figura 2B). Además, los resultados demuestran que ni el porcentaje ni el grado de expresión de marcadores de superficie (CD80, CD86, MHC-II, CD11a, CD11b, CD11c y Gr1), que indican el grado de diferenciación/activación de la población de células F4/80<sup>+</sup> (45, 127), están modificados por la falta de expresión de Cot/tpl-2 (Figura 2C-D). Estos datos indican

que el estado de diferenciación y activación de estos macrófagos en respuesta a la estimulación con tioglicolato no varía con la deficiencia de Cot/tpl-2.



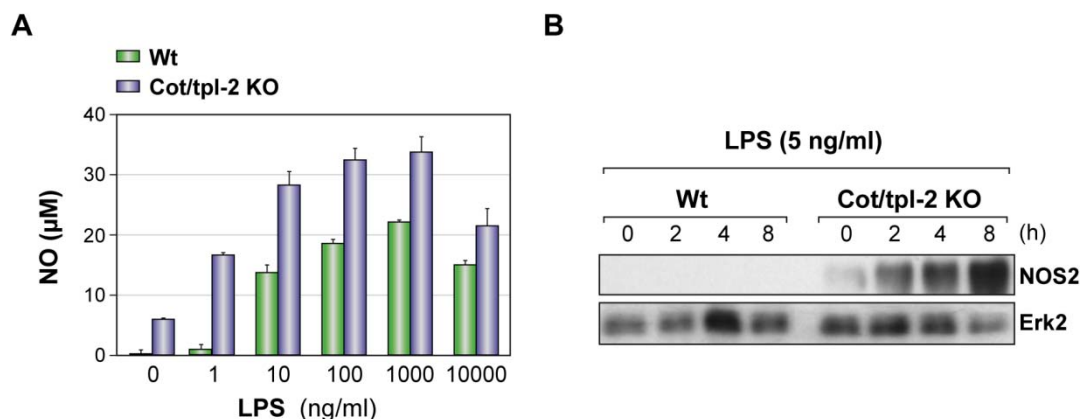
**Figura 2. Análisis de marcadores de superficie por citometría de flujo en macrófagos peritoneales obtenidos tras la inyección de tioglicolato en ratones Wt y Cot/tpl-2 KO.** **A)** Los histogramas representan el porcentaje de células F4/80<sup>+</sup>, Gr1<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, y CD8<sup>+</sup> presentes en el peritoneo tras la estimulación de ratones Wt y Cot/tpl-2 KO con tioglicolato. **B)** Análisis cuantitativo de la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de los marcadores indicados en A). **C)** Los histogramas representan el porcentaje de células F4/80<sup>+</sup> aisladas del peritoneo de ratones Wt y Cot/tpl-2 KO positivas para los marcadores CD80, CD86, MHC-II, CD11a, CD11b, CD11c, y Gr1. **D)** Análisis cuantitativo de la media de intensidad de fluorescencia de los marcadores descritos en C). **A-D)** Los histogramas muestran un experimento representativo de los 3 experimentos independientes realizados.

Tras la estimulación de los macrófagos peritoneales con LPS, la deficiencia de Cot/tpl-2 induce una mayor expresión del RNA mensajero (mRNA) y de proteína de NOS2 y consecuentemente, mayor liberación de su producto, óxido nítrico (NO) (Figura 3A-C). Además, los macrófagos Cot/tpl-2 KO también presentan mayor expresión del factor de transcripción IRF1, otro marcador de la activación clásica de los macrófagos o M1 (78), con respecto a los macrófagos Wt tras la estimulación con LPS (Figura 3C). Sin embargo, como se había descrito previamente, los macrófagos Cot/tpl-2 KO presentan menor expresión del mediador inflamatorio COX2 tras la estimulación con LPS (31) (Figura 3C).



**Figura 3. Cot/tpl-2 reprime la expresión de NOS2 en macrófagos peritoneales.** **A)** Macrófagos peritoneales de ratones Wt y Cot/tpl-2 KO se estimularon con LPS (300 ng/ml) durante los periodos de tiempo indicados. La concentración de óxido nítrico (NO) se determinó por triplicado en el sobrenadante de estas células. **B)** Análisis mediante RT-PCR de la expresión del RNA mensajero (mRNA) de NOS2 en macrófagos peritoneales tras la estimulación con LPS (100 ng/ml) durante los periodos de tiempo indicados. Los niveles de mRNA se normalizaron respecto a los niveles de RNA ribosomal 18S (r18S) en cada ensayo. **A-B)** Se determinó la media + desviación estándar (SD) de 3 experimentos independientes. Se le ha asignado el valor arbitrario de 1 al Wt a tiempo cero. **C)** Los niveles de expresión de NOS2, IRF1 y COX2 se determinaron en los extractos celulares tratados como en B) mediante Western blot. La expresión de Erk2 se determinó como control de carga. Las gráficas representan la media + SD de la cuantificación de la expresión de NOS2 e IRF1 de 8 experimentos independientes, tras normalizar con los valores de Erk2, asignando el valor arbitrario de 1 al Wt a tiempo cero. Se muestra un experimento representativo de los 8 independientes realizados. **A-C)** Los datos presentados se analizaron con el test t de student. Los valores se consideraron como estadísticamente significativos cuando el p-valor fue menor de 0.05 ( $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*).

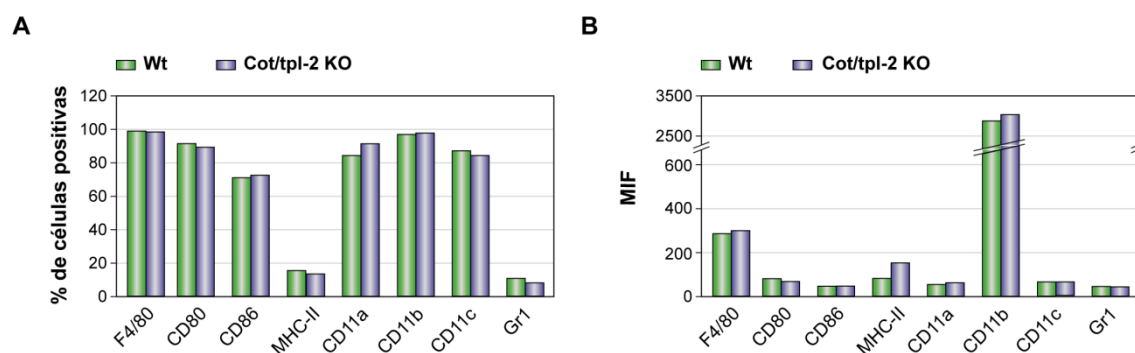
Además, la estimulación de macrófagos peritoneales en un rango de concentraciones de LPS (1-10000 ng/ml), indica que los macrófagos Cot/tpl-2 KO son más sensibles a la inducción de la expresión de NOS2 en respuesta a LPS, y por tanto a la producción de óxido nítrico, que los macrófagos peritoneales Wt (Figura 4A). La enzima NOS2 se detecta incluso en los macrófagos Cot/tpl-2 KO, pero no en los macrófagos Wt, tras la estimulación con una dosis baja de LPS (5 ng/ml) (Figura 4B).



**Figura 4. Curva de dosis de NO en respuesta a LPS en macrófagos peritoneales Wt y Cot/tpl-2 KO.**

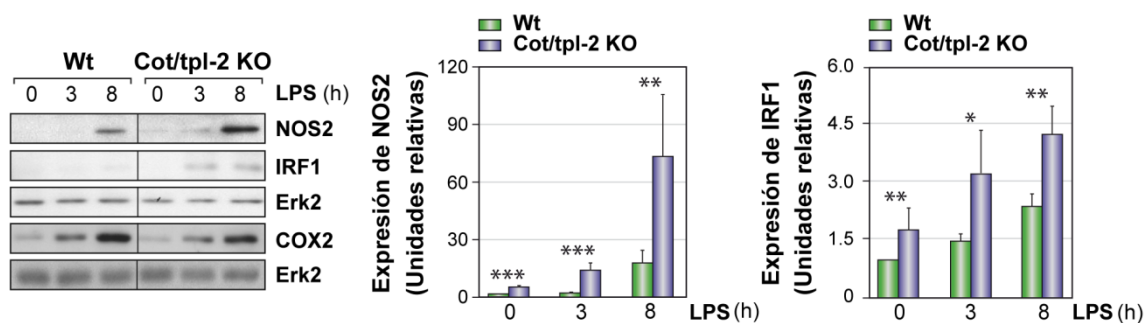
**A)** Los sobrenadantes de macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO se recolectaron tras 24 horas de estimulación con las concentraciones indicadas de LPS y los niveles de NO se determinaron por triplicado. Se muestra la media + SD de un experimento representativo de los 3 independientes realizados. **B)** La expresión de NOS2 se analizó en macrófagos peritoneales Wt y Cot/tpl-2 KO estimulados con LPS (5 ng/ml) durante los periodos de tiempo indicados. Los niveles de Erk2 se determinaron como control de carga. Se muestra un experimento representativo de los 3 experimentos realizados independientemente.

A continuación, decidimos analizar si Cot/tpl-2 también controla la expresión de NOS2 en macrófagos derivados de médula ósea (BMDM). Primero caracterizamos por citometría de flujo los marcadores de superficie de los macrófagos BMDM de ratones Wt y Cot/tpl-2 KO. El análisis de los marcadores de superficie F4/80, CD80, CD86, MHC-II, CD11a, CD11b, CD11c y Gr1 demuestra que ni el porcentaje ni el nivel de expresión de estos marcadores está modificado por la deficiencia de Cot/tpl-2 (Figura 5). Estos datos indican que Cot/tpl-2 no modula la diferenciación/activación de los macrófagos obtenidos tras la diferenciación de células precursoras de la médula ósea.



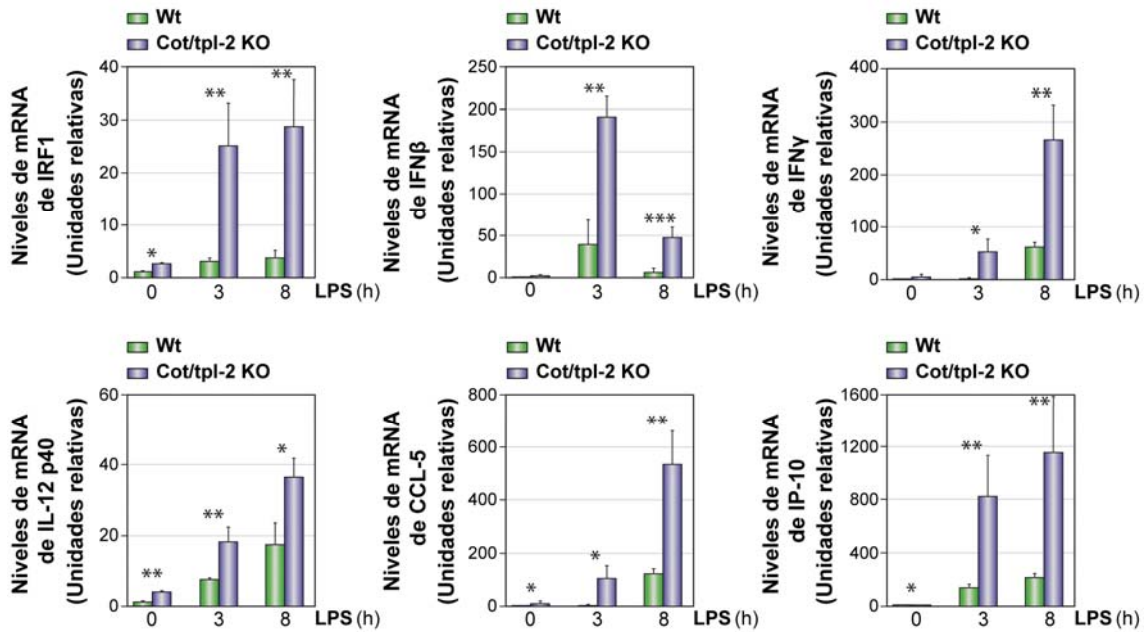
**Figura 5. Análisis por citometría de flujo de marcadores de superficie de macrófagos BMDM de ratones Wt y Cot/tpl-2 KO.** **A)** El histograma representa el porcentaje de células positivas para F4/80, CD80, CD86, MHC-II, CD11a, CD11b, CD11c y Gr1 en macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) de los ratones Wt y Cot/tpl-2 KO. **B)** Análisis cuantitativo de la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de los marcadores descritos en A). **A-B)** Se muestra un experimento representativo de 3 realizados de forma independiente.

Al igual que habíamos observado previamente en los macrófagos peritoneales, los macrófagos BMDM Cot/tpl-2 KO también presentan mayor expresión de las proteínas NOS2 e IRF1 y menor expresión de la proteína COX2 que los macrófagos Wt en respuesta a LPS (Figura 6). Todos estos datos indican que Cot/tpl-2 reprime la expresión de la enzima NOS2 y de IRF1 en macrófagos estimulados con LPS.



**Figura 6. Expresión de NOS2 en macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO.** Los niveles de expresión de NOS2, IRF1 y COX2 se determinaron en macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO tras estimulación con LPS (300 ng/ml) durante los periodos de tiempo indicados. La expresión de Erk2 se determinó como control de carga. Las gráficas representan la media + SD de la cuantificación de la expresión de NOS2 y de IRF1 tras normalizar con los valores de Erk2 de 8 experimentos independientes, asignando el valor arbitrario de 1 al Wt a tiempo cero. Se muestra un experimento representativo de los 8 independientes realizados. Los datos han sido analizados mediante el test t de student ( $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*).

Posteriormente, analizamos si Cot/tpl-2 controla la inducción de otros marcadores de activación M1 en macrófagos BMDM en respuesta a LPS a nivel de mRNA. Para ello, estimulamos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO durante 3 y 8 horas con LPS. Los resultados indican que Cot/tpl-2 también inhibe la expresión de IRF1 a nivel de mRNA en BMDM (Figura 7). Además, Cot/tpl-2 reprime la expresión de los transcritos de IFN $\gamma$ , CCL-5 e IP-10 (Figura 7). Asimismo, y en concordancia con datos publicados anteriormente, Cot/tpl-2 modula negativamente la expresión del mRNA de IL-12 p40 e IFN $\beta$  (59, 116) (Figura 7). Estos resultados demuestran que Cot/tpl-2 modula la expresión de genes implicados en la activación clásica de los macrófagos en respuesta a LPS.



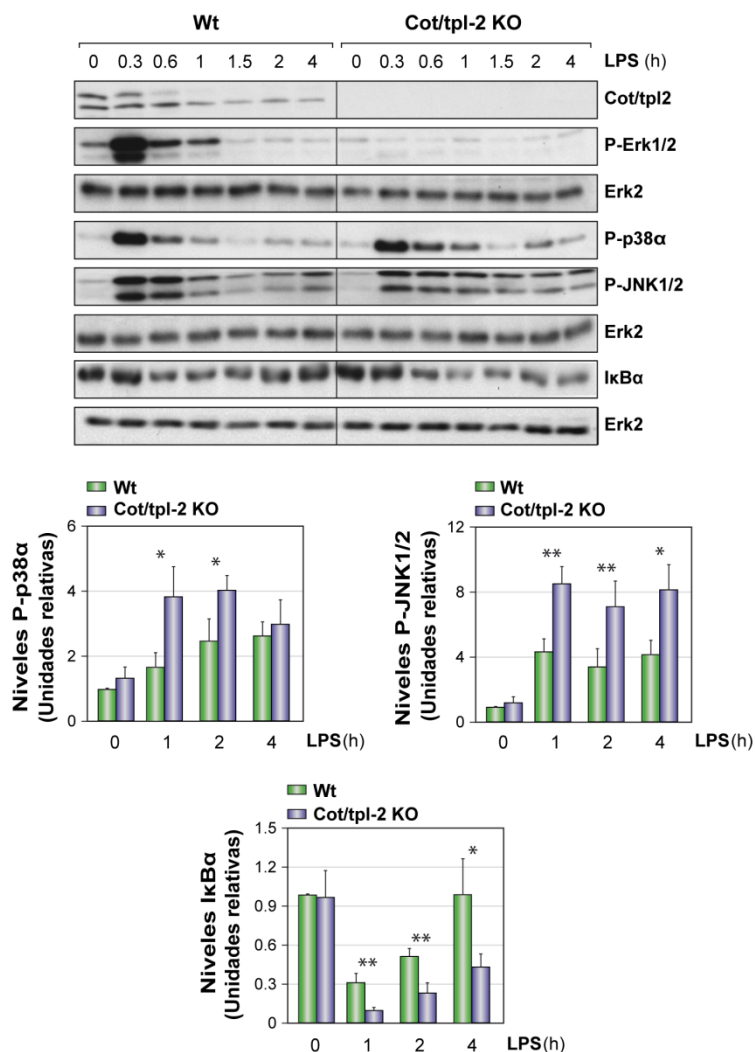
**Figura 7. Inducción de transcritos de citoquinas y quimioquinas en macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO estimulados con LPS.** Los niveles de mRNA de IRF1, IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-12 p40, CCL-5 e IP-10, se determinaron en macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO controles y estimulados durante 3 y 8 horas con LPS (300 ng/ml) mediante RT-PCR cuantitativa. Los niveles de mRNA se normalizaron respecto a los niveles de rRNA 18S en cada ensayo. Se muestra la media + SD de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Se le ha asignado el valor arbitrario de 1 al Wt a tiempo cero. Los datos han sido analizados con el test t de student ( $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*).

## 2. La deficiencia de Cot/tpl-2 induce una fosforilación más sostenida de p38 $\alpha$ y JNK1/2 y una menor recuperación de I $\kappa$ B $\alpha$ en macrófagos en respuesta a LPS

Para estudiar el mecanismo por el cual Cot/tpl-2 controla la expresión de NOS2, decidimos caracterizar la activación de las diferentes señales intracelulares inducidas en respuesta a LPS en los macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO. En concordancia con estudios previos, Cot/tpl-2 es necesaria para la fosforilación de Erk1/2 en respuesta a LPS y se degrada rápidamente en los macrófagos BMDM Wt (132) (Figura 8). Además, Cot/tpl-2 no es necesaria para la fosforilación de p38 $\alpha$  y JNK1/2 en respuesta a LPS, como se había determinado anteriormente (59, 106, 132). Sin embargo, la deficiencia de Cot/tpl-2 induce una fosforilación más sostenida en el tiempo de p38 $\alpha$  y JNK1/2 en respuesta a LPS en comparación con los macrófagos Wt (Figura 8). Por otro lado, aunque la cinética de degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  es similar en los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO en respuesta a LPS, la recuperación de I $\kappa$ B $\alpha$  es deficiente en los macrófagos Cot/tpl-2 KO. De hecho, los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  siguen

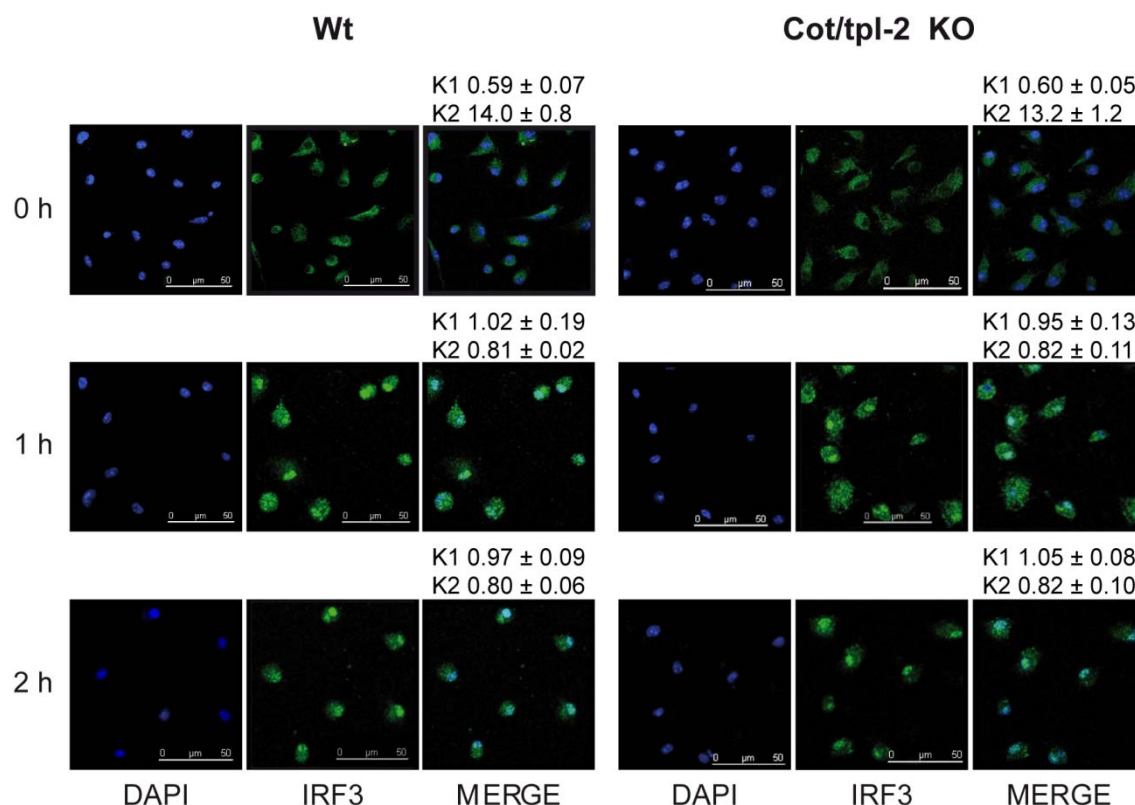


siendo bajos en los macrófagos Cot/tpl-2 KO a las 4 horas de estimulación con LPS (Figura 8).



**Figura 8: Estudio de la señalización intracelular inducida por LPS en macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO.** Macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO se estimularon con LPS (300 ng/ml) durante los periodos de tiempo indicados y los niveles de Cot/tpl-2, P-Erk1/2, P-p38α, P-JNK1/2, IκBα y Erk2 se determinaron mediante Western blot. Las gráficas representa la media + SD de P-p38α, P-JNK1/2 e IκBα tras normalizar los valores con Erk2 de 3 experimentos independientes. Se ha asignado el valor arbitrario de 1 al Wt a tiempo cero. Los datos han sido analizados con el test t de student ( $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*). Se muestra un experimento representativo de los 3 independientes realizados.

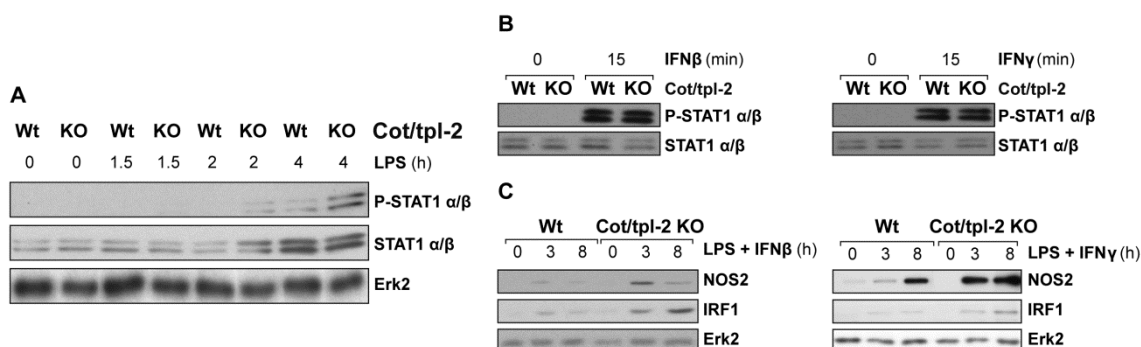
El LPS también activa al factor de transcripción IRF3 que se transloca al núcleo e induce la expresión de los genes IFN tipo I (IFNα e IFNβ) (135). Posteriormente, los IFNs tipo I activan a su vez la vía de señalización Jak/STAT1 induciendo la transcripción de genes diana (93). El estudio de la localización sub-celular de IRF3 por inmunofluorescencia demuestra que el factor de transcripción IRF3 se transloca del citosol al núcleo tras 1 ó 2 horas de estimulación con LPS, de forma similar en los macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO (Figura 9).



**Figura 9. Localización subcelular de IRF3 en macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO estimulados con LPS.** Se ha determinado la localización intracelular de IRF3 por inmunofluorescencia en macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO controles y estimulados con LPS (300 ng/ml) durante 1 o 2 horas. También se ha determinado la localización del núcleo con tinción con DAPI y la detección conjunta de IRF3 y DAPI (MERGE). Se ha analizado la media  $\pm$  SD de los coeficientes de solapamiento de IRF3 y DAPI (K1 y K2) de 3 experimentos independientes. Se muestra un experimento representativo de los 3 experimentos realizados independientemente.

Sin embargo, los macrófagos BMDM Cot/tpl-2 KO presentan una mayor fosforilación de STAT1 a las 4 horas de estimulación con LPS (Figura 10A), en concordancia con la mayor producción de IFN $\beta$  de estos macrófagos en respuesta a LPS (59) (Figura 7). Por otro lado, los macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO inducen niveles similares de fosforilación de STAT1 en respuesta a la estimulación por IFN $\beta$  o por IFN $\gamma$  (Figura 10B) y continúan presentando mayor expresión de NOS2 y de IRF1 en respuesta a la estimulación conjunta de LPS con IFN $\beta$  o con IFN $\gamma$  (Figura 10C). Todos estos datos indican que la deficiencia de Cot/tpl-2 induce una activación de las MAP quinasas p38 $\alpha$  y JNK1/2 más sostenida en el tiempo, una menor recuperación de I $\kappa$ B $\alpha$  y una mayor fosforilación de STAT1 en respuesta a LPS. Asimismo, los resultados demuestran que la mayor expresión de NOS2 e IRF1 como consecuencia de la deficiencia de Cot/tpl-2 no se debe, al menos exclusivamente, a la mayor fosforilación de STAT1.



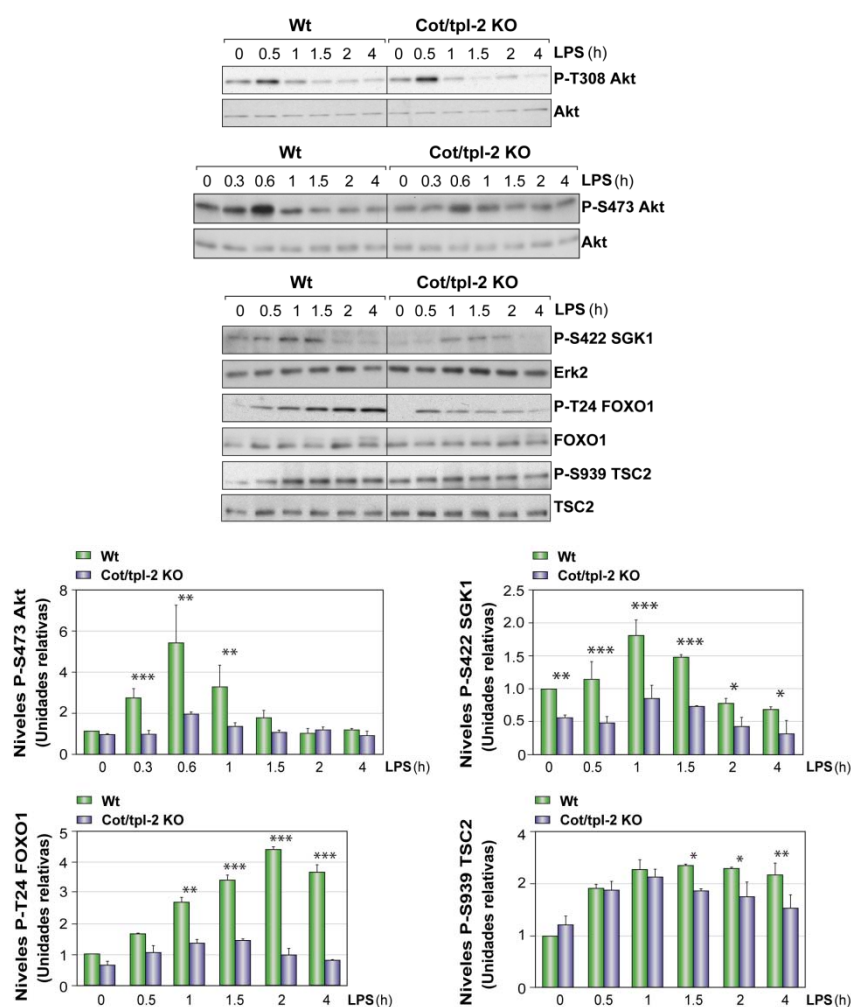


**Figura 10. Nivel de fosforilación de STAT1 en macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO estimulados con LPS.** **A)** Macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO se estimularon con LPS (300 ng/ml) durante los periodos de tiempo indicados y los niveles de P-T701 STAT1α/β, STAT1α/β y Erk2 se determinaron mediante Western blot. **B)** Macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO se trataron con IFNβ (300 U/ml) o con IFNγ (10 ng/ml) durante 15 minutos y los niveles de P-T701 STAT1α/β y STAT1α/β se determinaron mediante Western blot. **C)** Macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO se estimularon con LPS (300 ng/ml LPS) más IFNβ (300 U/ml) o más IFNγ (10 ng/ml) durante los periodos de tiempo indicados y los niveles de NOS2, IRF1 y Erk2 se determinaron mediante Western blot. **A-C)** Se muestra un experimento representativo de los 3 experimentos independientes realizados.

### 3. Cot/tpl-2 modula la activación de Akt y mTORC1 en macrófagos tras la estimulación con LPS

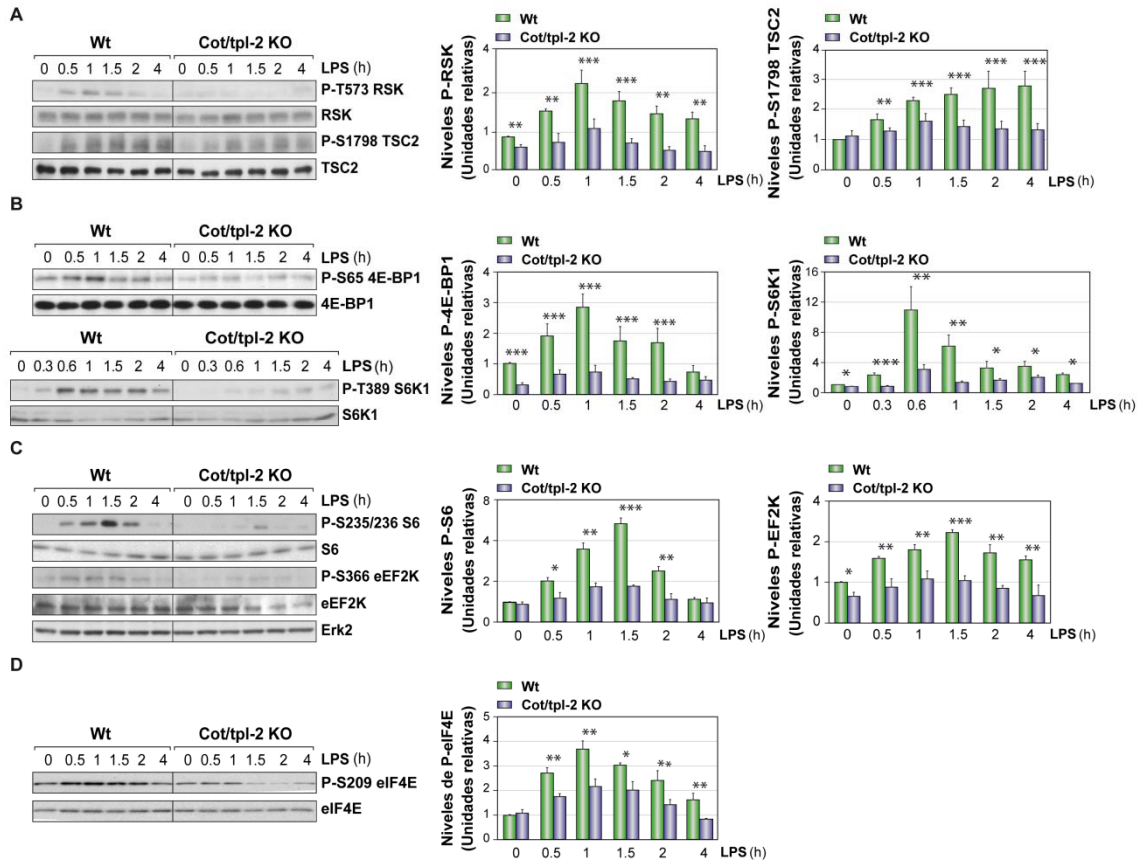
La vía de señalización de PI3K-Akt es un regulador negativo de la activación de las MAP quinasas, induce la expresión de IκBα y reprime la expresión de NOS2 en respuesta a LPS (28, 36, 50). Por lo cual, analizamos si la mayor fosforilación de las MAP quinasas p38α y JNK1/2, la menor expresión de IκBα y la mayor inducción de NOS2 presente en los macrófagos Cot/tpl-2 KO en comparación con los macrófagos Wt tras la estimulación con LPS, correlaciona con una deficiencia en la activación de la vía de PI3K-Akt. La activación de PI3K induce la fosforilación de PDK1, que subsecuentemente fosforila a Akt en el residuo T308 situado en el bucle de activación (80). Esta fosforilación de Akt por PDK1 permite que mTORC2 subsecuentemente fosforile a Akt en S473, induciendo su completa activación (49). La deficiencia de Cot/tpl-2 no afecta a la fosforilación de Akt en T308 por PDK1 en respuesta a LPS. Sin embargo, los macrófagos Cot/tpl-2 KO presentan una fosforilación de Akt en S473 deficiente tras la estimulación con LPS (Figura 11). Además, la fosforilación de SGK1 en S422, otro sustrato de mTORC2 (41), también está reducida en los macrófagos Cot/tpl-2 KO vs los macrófagos Wt en respuesta a LPS (Figura 11). Akt necesita estar fosforilada en ambos residuos para estar totalmente activa y fosforilar al factor de transcripción FOXO1 en T24 (49). Consecuentemente, los macrófagos deficientes en

Cot/tpl-2 presentan una menor fosforilación de FOXO1 tras la estimulación con LPS (Figura 11). Sin embargo, la fosforilación de Akt en T308 es suficiente para que Akt fosfore a TSC2 en S939 inhibiendo al complejo TSC1-TSC2 y activando por tanto al complejo mTORC1 (49). En concordancia con el mismo estado de fosforilación de Akt en T308 observado en los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO, la fosforilación de TSC2 en S939 por Akt sólo está reducida en un 20% en los macrófagos Cot/tpl-2 KO en comparación con los macrófagos Wt tras 90 minutos de estimulación con LPS (Figura 11).



**Figura 11. Cot/tpl-2 induce la activación de Akt en serina 473 en macrófagos BMDM en respuesta a LPS.** Macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO se estimularon con LPS (300 ng/ml) durante los tiempos indicados y los niveles de P-T308 Akt, P-S473 Akt, P-S422 SGK1, P-T24 FOXO1 y P-S939-TSC2 se determinaron mediante Western blot. Los niveles de Akt, Erk2, FOXO1 y TSC2 se determinaron como control de carga. Se muestra un Western blot representativo de los 3-5 realizados independientemente. Las gráficas representan la media + SD de 3-5 experimentos independientes de los niveles de P-Akt-S473, P-S422 SGK1, P-T24 FOXO1 y P-S939-TSC2, tras normalizar los valores con Akt, Erk2, FOXO1 y TSC2 respectivamente. Se ha asignado el valor arbitrario de 1 al Wt a tiempo cero. Los datos han sido analizados con el test t de student ( $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*).

La quinasas RSK, diana de Erk1/2, también inhibe a TSC2 mediante fosforilación en el residuo S1798, activando por tanto al complejo mTORC1 (107). Los macrófagos Cot/tpl-2 KO muestran una reducción estadísticamente significativa de P-T573 RSK y P-S1798 TSC2, en comparación con los macrófagos Wt, tras la estimulación con LPS (Figura 12A). Consecuentemente, la fosforilación de los sustratos de mTORC1: 4E-BP1 y S6K1 (102) también disminuye con la deficiencia de Cot/tpl-2 (Figura 12B). Asimismo, los macrófagos Cot/tpl-2 KO presentan menor fosforilación de S6 en S235/236 y de eEF2K en S366 (Figura 12C), dianas directas de S6K1 y de RSK (3), vs sus homólogos Wt. La vía de señalización de mTORC1 está implicada en la regulación de la traducción Cap-dependiente. La fosforilación de 4E-BP1 es un evento clave en la disociación de 4E-BP1 de la proteína de unión a Cap eIF4E, permitiendo que se forme el complejo de pre-iniciación de la traducción activo eIF4F, que recluta al ribosoma (102). Asimismo, la fosforilación de la proteína ribosomal S6 está relacionada con una asociación más eficiente del ribosoma al complejo de iniciación (108). El complejo mTORC1 no sólo regula la iniciación de la traducción sino que también activa la elongación. La fosforilación e inhibición de eEF2K permite que eEF2K no fosforile e inhiba al factor de elongación de la traducción eEF2 (102). Además, nuestros resultados indican que la fosforilación de la proteína de unión a Cap eIF4E en S209 por MNK, diana de p38 $\alpha$  y de Erk1/2 (122, 124) está también disminuida en los macrófagos Cot/tpl-2 KO (Figura 12D). Todos estos datos indican que los macrófagos deficientes en Cot/tpl-2 presentan una fosforilación disminuida de Akt en S473 y también de RSK y por lo tanto, una menor fosforilación de todas las dianas efectoras de RSK analizadas tras la estimulación con LPS en comparación con sus homólogos Wt.

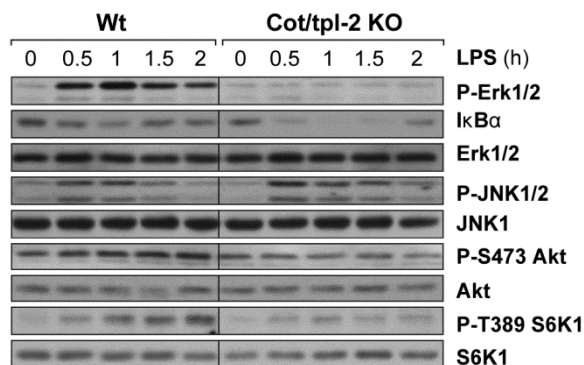


**Figura 12. Cot/tpl-2 controla la fosforilación de RSK y de sus dianas efectoras en macrófagos BMDM estimulados con LPS. A-D)** Macrófagos BMDM de ratones Wt y Cot/tpl-2 KO se estimularon con LPS (300 ng/ml) durante los tiempos indicados y los niveles de P-T573 RSK, P-T1798 TSC2, P-S65-4E-BP1, P-T389 S6K1, P-S235/236 S6, P-S366 eEF2K y P-S209 eIF4E se determinaron mediante Western blot. Los niveles de RSK, TSC2, 4E-BP1, S6K1, S6, eEF2K, Erk2 y eIF4E se determinaron también como control de carga. Se muestra un Western blot representativo de los 3-5 independientes realizados. Las gráficas representan la media + SD de los niveles de P-T573 RSK, P-T1798 TSC2, P-S65-4E-BP1, P-T389 S6K1, P-S235/236 S6, P-S366 eEF2K y P-S209 eIF4E tras normalizar los valores con RSK, TSC2, 4E-BP1, S6K1, S6, eEF2K y eIF4E respectivamente de 3-5 experimentos independientes. Se ha asignado el valor arbitrario de 1 al Wt a tiempo cero. Los datos han sido analizados con el test t de student ( $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*).

#### 4. La inhibición de PI3K iguala los niveles de NOS2 e I $\kappa$ B $\alpha$ entre los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO en respuesta a LPS

Anteriormente, hemos demostrado que en macrófagos BMDM estimulados con LPS, la deficiencia de Cot/tpl-2 provoca una disminución de los niveles expresión de I $\kappa$ B $\alpha$ , una fosforilación más sostenida en el tiempo de las MAP quinasas p38 $\alpha$  y JNK1/2, un aumento de los niveles de expresión de NOS2 y una activación deficiente de la vía de Akt y mTORC1. En concordancia con estos datos, los macrófagos Cot/tpl-

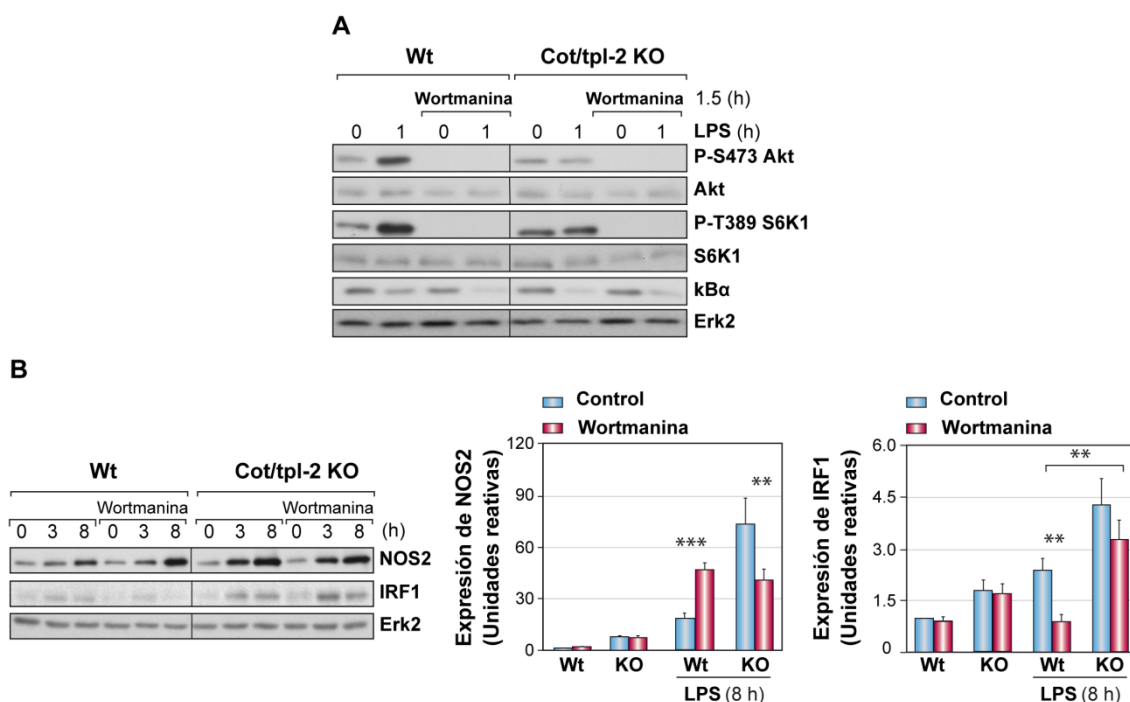
2 KO peritoneales también muestran menor recuperación de I $\kappa$ B $\alpha$ , mayor fosforilación de la MAP quinasa JNK1/2, y menor fosforilación de Akt S473 y de la diana de mTORC1, S6K1, que los macrófagos Wt en respuesta a LPS (Figura 13).



**Figura 13. Control de las vías de señalización en respuesta a LPS en macrófagos peritoneales por Cot/tpl-2.**

Macrófagos peritoneales Wt y Cot/tpl-2 KO se estimularon con LPS (300 ng/ml) durante los periodos de tiempo indicados y los niveles de P-Erk1/2, I $\kappa$ B $\alpha$ , Erk2, P-JNK1/2, JNK1, P-S473 Akt, Akt, P-T389 S6K1 y S6K1 se determinaron mediante Western blot. Se muestra un experimento representativo de los 3 independientes realizados

Como ya hemos comentado anteriormente, está establecido que la vía de señalización de PI3K-Akt modula negativamente la fosforilación de las MAP quinastas, induce la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  y reprime la expresión de NOS2 en respuesta a LPS (28, 36, 50). Para analizar si los menores niveles de expresión de NOS2 y los mayores niveles de expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  en los macrófagos Wt con respecto a los macrófagos Cot/tpl-2 KO se deben a la capacidad de Cot/tpl-2 de modular la activación de la vía de Akt en respuesta a LPS, tratamos los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO con el inhibidor de PI3K wortmanina. En concordancia con estudios previos, el pre-tratamiento de los macrófagos con wortmanina inhibe totalmente la fosforilación de Akt y de S6K1, sustrato de mTORC1, y disminuye la recuperación de los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  en los macrófagos Wt estimulados con LPS (36, 50) (Figura 14A). Sin embargo, el tratamiento con wortmanina no induce una menor recuperación de los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  en los macrófagos BMDM Cot/tpl-2 KO, igualándose los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  entre los macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO (Figura 14A). Además, tal y como está descrito, el pre-tratamiento con wortmanina incrementa la expresión de NOS2 en respuesta a LPS (28) (Figura 14B). Sin embargo, el tratamiento con wortmanina reduce la expresión de NOS2 en los macrófagos Cot/tpl-2 KO eliminándose así las diferencias de expresión de NOS2 entre los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO (Figura 14B). Por otro lado, el tratamiento con wortmanina no iguala los niveles de IRF1 entre los macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO. De hecho, la wortmanina disminuye la inducción de IRF1 en los macrófagos Wt, pero no modula los niveles de IRF1 en los macrófagos Cot/tpl-2 KO en respuesta a LPS (Figura 14B).



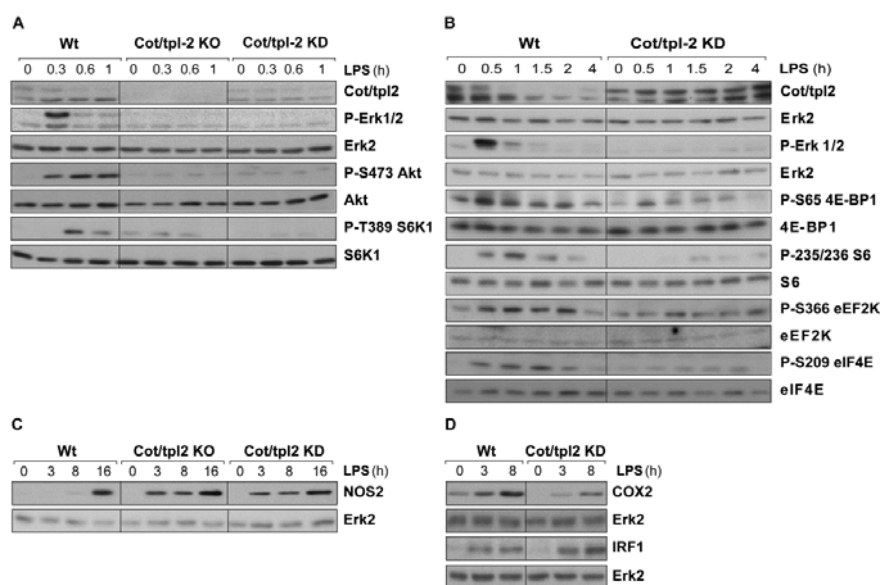
**Figura 14. El tratamiento con wortmanina iguala los niveles de IκBα y NOS2 entre los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO en respuesta a LPS. A)** Macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO se pre-incubaron con wortmanina (230 nM) 30 minutos antes de ser estimulados con LPS durante una hora. Posteriormente, los niveles de P-S473 Akt, Akt, P-T389 S6K1, S6K1, IκBα y Erk2 se determinaron mediante Western blot. **B)** Macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO se pre-incubaron con wortmanina y se estimularon con LPS durante los periodos de tiempo indicados y los niveles de NOS2 e IRF1 se analizaron mediante Western blot. Los niveles de Erk2 se determinaron como control de carga. Las gráficas representan la media + SD de los niveles de NOS2 e IRF1 tras normalizar los valores con Erk2 de 3 experimentos independientes. Se ha asignado el valor arbitrario de 1 al Wt a tiempo cero control. Los datos han sido analizados con el test t de student ( $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*). **A-B)** Se muestra un experimento representativo de los 3 independientes realizados.

## 5. Los macrófagos Cot/tpl-2 KD reproducen el fenotipo de los macrófagos Cot/tpl-2 KO

Para analizar si la deficiencia en la fosforilación de Akt S473 y de las dianas de mTORC1 se debe a la falta de expresión de la proteína Cot/tpl-2 o a la falta de su actividad quinasa, decidimos analizar los niveles de expresión de estas proteínas en los macrófagos Cot/tpl-2 KD. Estos macrófagos expresan Cot/tpl-2 con una mutación puntual en donde la lisina responsable de la unión a ATP (lisina 167) es reemplazada por una arginina, inhibiéndose así su actividad quinasa. Los resultados demuestran que los macrófagos Cot/tpl-2 KD, expresan Cot/tpl-2 pero no inducen la fosforilación de Erk1/2 tras la estimulación con LPS (Figura 15A-B). Sin embargo, Cot/tpl-2 no es rápidamente degradada en los macrófagos Cot/tpl-2 KD, como se observa en los



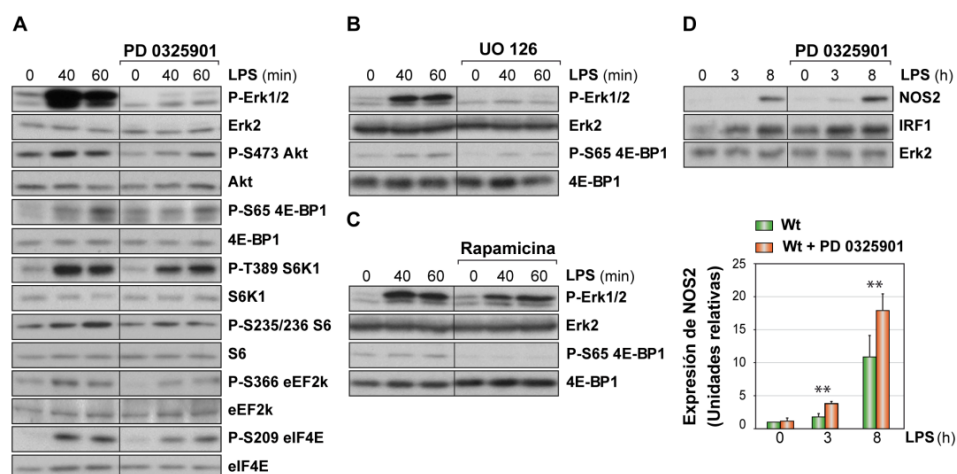
macrófagos Wt, en respuesta a LPS (Figura 15A-B). La falta de actividad de Cot/tpl-2 induce una menor fosforilación de Akt en S473 así como una menor fosforilación de S6K1, 4E-BP1, S6, eEF2K y eIF4E (Figura 15A-B) tras la estimulación con LPS. Asimismo, al igual que lo observado en los macrófagos Cot/tpl-2 KO, los macrófagos Cot/tpl-2 KD también muestran mayores niveles de expresión de NOS2 e IRF1 y menores niveles de expresión de COX2 que los macrófagos Wt en respuesta a LPS (Figura 15C-D). Estos datos indican que la actividad quinasa de Cot/tpl-2 induce la fosforilación de Akt y de las dianas de mTORC1, así como modula los niveles de expresión de NOS2, IRF1 y COX2 tras la estimulación con LPS.



**Figura 15. Los macrófagos Cot/tpl-2 KD presentan una menor fosforilación de Akt S473 y de las dianas de mTORC1 y mayores niveles de expresión de NOS2 que los macrófagos Wt en respuesta a LPS. A)** Macrófagos BMDM Wt, Cot/tpl-2 KO y Cot/tpl-2 KD se estimularon con LPS (300 ng/ml) durante los tiempos indicados y los niveles de Cot/tpl-2, P-Erk1/2, Erk2, P-S473 Akt, Akt, P-T389 S6K1 y S6K1 se determinaron mediante Western blot. **B)** Macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KD se estimularon con LPS (300 ng/ml) durante los tiempos indicados y los niveles de Cot/tpl-2, P-Erk1/2, Erk2, P-S65 4E-BP1, 4E-BP1, P-S235/236 S6, S6, P-S366 eEF2K, eEF2K, P-S209 eIF4E y eIF4E se determinaron mediante Western blot. **C)** Macrófagos BMDM de ratones Wt, Cot/tpl-2 KO y Cot/tpl-2 KD se estimularon con LPS (300 ng/ml) durante los tiempos indicados y los niveles de NOS2 y Erk2 se determinaron mediante Western blot. **D)** Macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KD se estimularon con LPS (300 ng/ml) durante los tiempos indicados y los niveles de COX2, IRF1 y Erk2 se determinaron mediante Western blot. **A-D)** Se muestra un experimento representativo de los 3 independientes realizados.

También decidimos estudiar si la actividad quinasa de Cot/tpl-2 controla la activación de Akt y de mTORC1, debido a su capacidad de activar Erk1/2. Para ello, pre-incubamos los macrófagos BMDM Wt con el inhibidor altamente específico de MKK1/2, PD 0325901, que bloquea la fosforilación de Erk1/2. Nuestros datos indican que el tratamiento de los macrófagos BMDM Wt con PD 0325901 reproduce el

fenotipo de los macrófagos Cot/tpl-2 KO. Así, la falta de activación de Erk1/2 en los macrófagos Wt tratados con PD 0325901, correlaciona con la menor fosforilación de Akt en S473, de las dianas de mTORC1 y de eIF4E en respuesta a LPS (Figura 16A). Además, el pre-tratamiento con UO 126, otro inhibidor de MKK1/2, o con rapamicina, un inhibidor de mTORC1, también reduce la fosforilación de 4E-BP1 en respuesta a LPS (Figura 16B-C). Asimismo, tras la estimulación con LPS, los macrófagos Wt tratados con PD 0325901 muestran mayores niveles de expresión de NOS2 y de IRF1 que los macrófagos Wt sin tratar (Figura 16D). Sin embargo, mientras que el tratamiento con PD 0325901 induce un aumento en los niveles de expresión de NOS2 de aproximadamente 2 y 1.6 veces a 3 y 8 horas de estimulación con LPS respectivamente en comparación con los macrófagos Wt sin tratar (Figura 16D), la deficiencia de Cot/tpl-2 induce un aumento en los niveles de expresión de NOS2 de aproximadamente 7 y 4 veces a 3 y 8 horas de estimulación con LPS respectivamente en comparación con los macrófagos Wt (Figura 6, página 65).

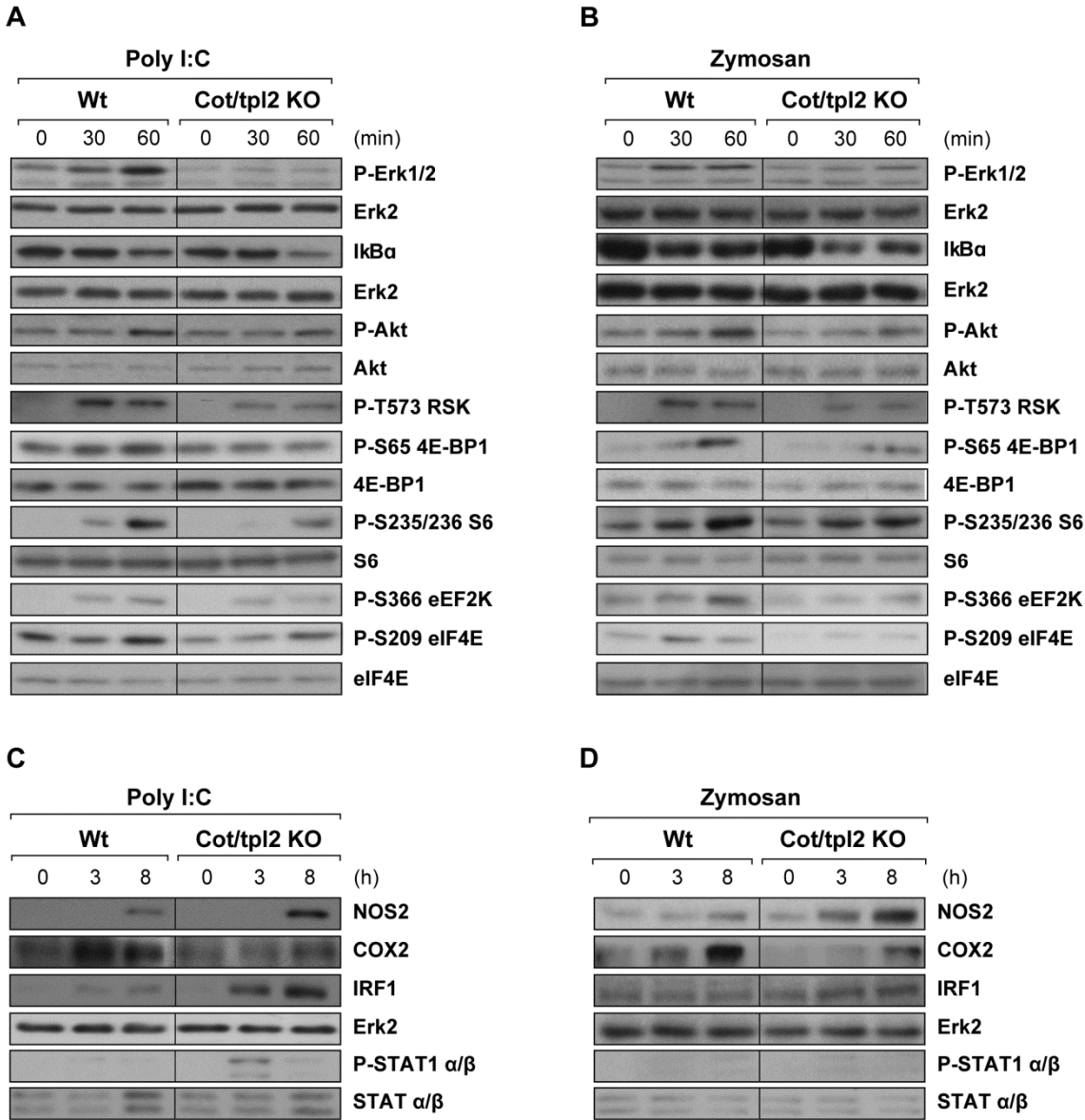


**Figura 16. La inhibición de Erk1/2 induce una menor fosforilación de Akt y de las dianas de mTORC1 y una mayor expresión de NOS2 en macrófagos Wt en respuesta a LPS.** **A)** Los macrófagos Wt BMDM se pre-incubaron con PD 0325901 (0.5  $\mu$ M) treinta minutos antes de ser estimulados con LPS durante los periodos de tiempo indicados. Posteriormente, los niveles de P-Erk1/2, Erk2, P-S473 Akt, P-S65 4E-BP1, 4E-BP1, P-T389 S6K1, S6K1, P-S235/236 S6, S6, P-S366 eEF2K, eEF2K, P-S209 eIF4E y eIF4E se determinaron mediante Western blot **B-C)** Los macrófagos BMDM Wt se pre-incubaron con UO 126 (10  $\mu$ M) (B) o con rapamicina (20 nM) (C) 30 minutos antes de ser estimulados con LPS durante los periodos de tiempo indicados. Posteriormente, los niveles de P-Erk1/2, Erk2, P-S65 4E-BP1 y 4E-BP1 se determinaron mediante Western blot. **D)** Los macrófagos Wt tratados como se ha descrito en A) se estimularon con LPS (300 ng/ml) durante los periodos de tiempo indicados y los niveles de NOS2, IRF1 y Erk2 se determinaron mediante Western blot. La gráfica representan la media + SD de los niveles de NOS2 tras normalizar con los valores de Erk2 de 3 experimentos independientes. Se ha asignado el valor arbitrario de 1 al Wt a tiempo cero. Los datos han sido analizados con el test t de student ( $p < 0.01$  \*\*). **A-D)** Se muestra un experimento representativo de los 3 experimentos independientes realizados.



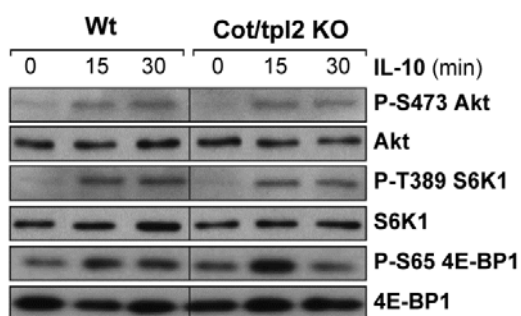
## 6. Cot/tpl-2 controla la fosforilación de Akt, la activación de mTORC1 y la expresión de NOS2 en respuesta a la activación de los receptores TLR3 y TLR2/6

El LPS recluta tanto al adaptador MyD88 como al adaptador TRIF (1, 61). Para determinar si la capacidad de Cot/tpl-2 de controlar la fosforilación de Akt y de las dianas de mTORC1 es dependiente del reclutamiento de uno de estos dos adaptadores, decidimos estimular macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO con poly I:C que activa al receptor TLR3 reclutando sólo al adaptador TRIF (91) y con zymosan que en macrófagos activa al receptor TLR2/6 reclutando sólo al adaptador MyD88 (40). Los resultados demuestran que en macrófagos, Cot/tpl-2 induce tanto la fosforilación de Akt en S473 como la fosforilación de RSK y de sus dianas de forma independiente del adaptador reclutado (Figura 17A-B). Por otro lado, los macrófagos Cot/tpl-2 KO presentan una fosforilación deficiente de la proteína de unión a Cap eIF4E en respuesta a zymosan y a poly I:C (Figura 17A-B). Asimismo, los macrófagos Cot/tpl-2 KO presentan una menor recuperación de I $\kappa$ B $\alpha$  en respuesta a la activación del TLR3 y del TLR2/6 (Figura 17 A-B) con respecto a sus homólogos Wt. La deficiencia de Cot/tpl-2 induce también mayores niveles de expresión de NOS2 e IRF1 y menores niveles de expresión de COX2 en respuesta a zymosan y a poly I:C (Figura 17C-D). Además, los macrófagos Cot/tpl-2 KO presentan mayor fosforilación de STAT1 $\alpha/\beta$  en respuesta a poly I:C en comparación con los macrófagos Wt. Sin embargo, el zymosan apenas induce la fosforilación de STAT1 $\alpha/\beta$  ni en los macrófagos BMDM Wt ni en los macrófagos BMDM Cot/tpl-2 KO (Figura 17 C-D), como es de esperar porque la fosforilación de STAT1 en respuesta a la activación de los TLRs es un evento TRIF dependiente (93).



**Figura 17. Cot/tpl-2 controla la activación de las vías de Akt y mTORC1 y la expresión de NOS2 e IRF1 en respuesta a zymosan y a poly I:C.** A-D) Macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO se estimularon con poly I:C (50 µg/ml) (A y C) o con zymosan (10 µg/ml) (B y D) durante los periodos de tiempo indicados y los niveles de P-Erk1/2, Erk2, P-S473 Akt, Akt, Ikbα, P-T573 RSK, P-S65 4E-BP1, 4E-BP1, P-T389 S6K1, S6K1, P-S366 S6, S6, P-S366 eEF2K, eEF2K, P-S209 eIF4E y eIF4E (A-B) y de NOS2, COX2, IRF1, Erk2, P-T701 STAT1α/β y STAT1α/β (C-D) se determinaron mediante Western blot. Se muestra un experimento representativo de los 3 experimentos independientes realizados.

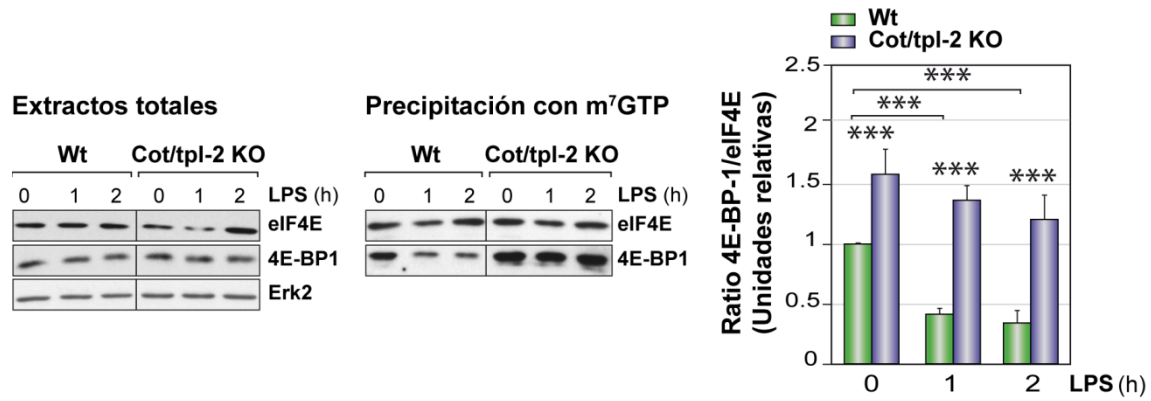
Sin embargo, la deficiencia de Cot/tpl-2 no afecta a la fosforilación de Akt en S473 ni a la fosforilación de las dianas de mTORC1: 4E-BP1 y S6K1, en respuesta a la estimulación de los macrófagos BMDM con IL-10 (Figura 18), señalando la especificidad del efecto.



**Figura 18. Cot/tpl-2 no controla la activación de Akt, S6K1 y 4E-BP1 en macrófagos BMDM en respuesta a IL-10.** Macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO se estimularon con IL-10 (50 ng/ml) durante los periodos de tiempo indicados y los niveles de P-S473 Akt, Akt, P-S65 4E-BP1, 4E-BP1, P-T389 S6K1 y S6K1 se determinaron mediante Western blot. Se muestra un experimento representativo de los 3 experimentos independientes realizados.

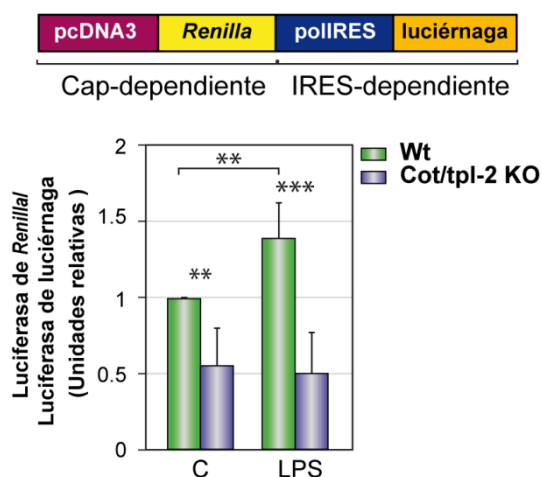
## 7. Cot/tpl-2 regula la traducción Cap-dependiente en macrófagos BMDM estimulados con LPS

La fosforilación de 4E-BP1 por mTORC1 permite que 4E-BP1 se disocie de la proteína de unión a Cap eIF4E, siendo este el evento clave de la activación de la traducción de proteínas Cap-dependiente (102). A continuación, decidimos analizar si la menor fosforilación de 4E-BP1 observada en los macrófagos BMDM Cot/tpl-2 KO controles y estimulados con LPS en comparación con los macrófagos BMDM Wt (Figura 12, página 72) correlaciona con una menor disociación del complejo 4E-BP1-eIF4E. Para ello, los extractos proteicos de macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 no estimulados y estimulados durante 1 ó 2 horas con LPS, se incubaron con una resina unida a la estructura Cap ( $m^7$ GTP), con alta afinidad por eIF4E. Posteriormente, las proteínas unidas a  $m^7$ GTP se precipitaron y los niveles de eIF4E y 4E-BP1 se determinaron mediante Western blot. En condiciones basales, los macrófagos Cot/tpl-2 KO ya presentan mayor asociación de 4E-BP1 a eIF4E en comparación con los macrófagos Wt (Figura 19). Además, la cantidad de 4E-BP1 unida a eIF4E disminuye de forma estadísticamente significativa en los macrófagos Wt tras la estimulación con LPS, pero no en los macrófagos Cot/tpl-2 KO (Figura 19).



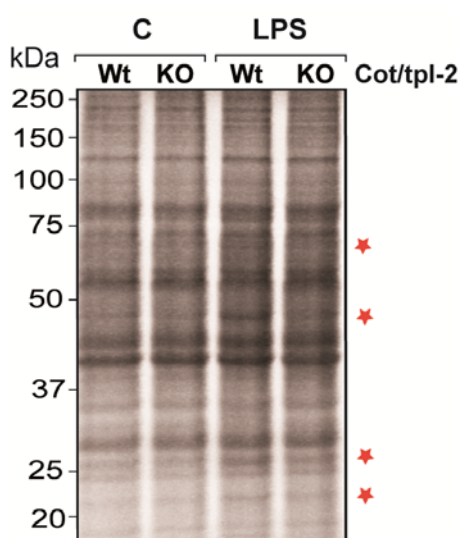
**Figura 19. Cot/tpl-2 induce la disociación del complejo 4E-BP1-eIF4E en macrófagos estimulados con LPS.** Extractos celulares de macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO no estimulados y estimulados durante 1 ó 2 horas con LPS (300 ng/ml), se precipitaron con bolas de sefarosa unidas a m<sup>7</sup>GTP y la cantidad de 4E-BP1 unido a eIF4E se analizó mediante Western blot. La gráfica muestra la media + SD del ratio 4E-BP1/eIF4E obtenido tras la precipitación de 3 experimentos independientes. Se ha asignado el valor arbitrario de 1 al Wt a tiempo cero. Se muestra un experimento representativo de los 3 independientes realizados. Los datos han sido analizados con el test t de student ( $p < 0.001$  \*\*\*).

Para estudiar si la capacidad de Cot/tpl-2 de inducir la fosforilación de 4E-BP1 y subsecuente disociación de eIF4E afecta a la traducción de promotores Cap-dependientes, nucleotransfectamos macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO con un plásmido bicistrónico en donde el cDNA de luciferasa de *Renilla* sólo se traduce de forma Cap-dependiente y el cDNA de luciferasa de luciérnaga sólo se traduce de forma IRES-dependiente (Figura 20). Tras la estimulación con LPS, los macrófagos Wt inducen un aumento en el ratio de traducción Cap-dependiente vs IRES-dependiente de forma estadísticamente significativa. Sin embargo, los macrófagos Cot/tpl-2 KO no incrementan el ratio de traducción Cap-dependiente vs IRES-dependiente en respuesta a LPS (Figura 20). Esta variación en el ratio de traducción Cap-dependiente vs IRES-dependiente entre los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 en respuesta a LPS, no se debe a diferencias en la traducción IRES-dependiente, ya que la traducción IRES-dependiente no está modificada ni por Cot/tpl-2 ni por la estimulación con LPS (datos no mostrados).



**Figura 20. Cot/tpl-2 induce la traducción Cap-dependiente.** Macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO se nucleotransfectaron con el plásmido bicistrónico especificado en el panel superior. A continuación, las células se estimularon con LPS (300 ng/ml) durante 3 horas y la luminiscencia emitida por las luciferasas de *Renilla* y luciérnaga se cuantificó en un luminómetro. Las gráficas representan la media + SD del ratio de luminiscencia *Renilla*/luciérnaga de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Se ha asignado el valor arbitrario de 1 al Wt a tiempo cero. Los datos han sido analizados con el test t de student ( $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*).

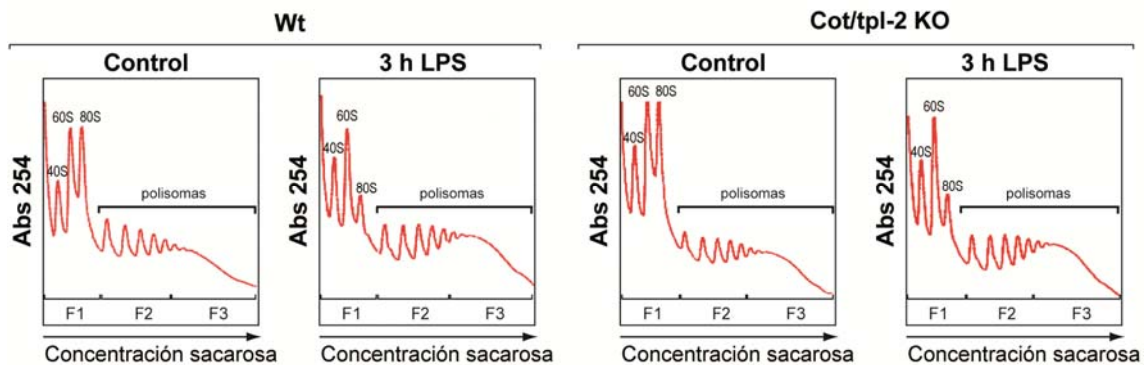
A continuación, decidimos estudiar si la capacidad de Cot/tpl-2 de activar la vía de señalización de mTORC1 y la traducción de promotores Cap-dependientes afecta a la eficiencia de síntesis de proteínas en respuesta a LPS. Para ello, estudiamos la eficiencia de traducción en macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO tras 3 horas de estimulación con LPS, mediante el análisis de la incorporación de cisteína y metionina marcadas radioactivamente en  $^{35}\text{S}$ . Los resultados demuestran que los macrófagos Cot/tpl-2 KO presentan una deficiencia en la incorporación de  $^{35}\text{S}$  en al menos cuatro proteínas en respuesta a LPS en comparación con los macrófagos Wt (Figura 21). Todos estos datos indican que Cot/tpl-2 regula la traducción de mRNA Cap-dependiente en macrófagos en respuesta a LPS.



**Figura 21. Cot/tpl-2 induce la incorporación de  $^{35}\text{S}$  en varias proteínas en respuesta a LPS.** Macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO se estimularon con LPS (300 ng/ml) durante 3 horas. Treinta minutos antes de recoger los extractos, las células se trataron con cisteína y metionina marcadas en  $^{35}\text{S}$ . A continuación, la incorporación de  $^{35}\text{S}$  en las proteínas de los extractos se determinó mediante Western blot. Las estrellas indican las bandas de aproximadamente 70, 45, 26 y 23 kDa en donde los macrófagos Cot/tpl-2 KO muestran menor incorporación de  $^{35}\text{S}$  que los macrófagos Wt en respuesta a LPS.

## 8. Cot/tpl-2 controla la traducción de los 5' TOP mRNAs eEF1 $\alpha$ y eEF2

A continuación, decidimos analizar también la eficiencia de traducción de mRNAs en macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO en respuesta a LPS mediante el estudio del perfil de polisomas, que indica cuantos ribosomas están asociados a mRNAs. Para ello, analizamos el reclutamiento de mRNA en polisomas en los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO mediante un gradiente lineal de sacarosa. Los resultados demuestran que el LPS induce un mayor reclutamiento de ribosomas al mRNA incrementando el número de polisomas tras 3 horas de estimulación con LPS. Sin embargo, no hay diferencias entre los macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO (Figura 22). Para analizar la eficiencia de traducción de mRNAs específicos, los extractos se dividieron en tres fracciones siguiendo el perfil de polisomas como se indica en la Figura 22. La fracción 1 (F1) contiene los mensajeros que co-sedimentan con las subunidades del ribosoma 40S y 60S o con monosomas (80S), que comprende los mRNAs que no están siendo traducidos. La fracción 2 (F2) contiene los mensajeros asociados a polisomas de bajo peso molecular, que incluye transcritos largos que están siendo traducidos a niveles moderados y transcritos cortos que están siendo eficientemente traducidos. La fracción 3 (F3) contiene los mRNAs asociados a polisomas de alto peso molecular, que engloba los transcritos largos que están siendo traducidos eficientemente.

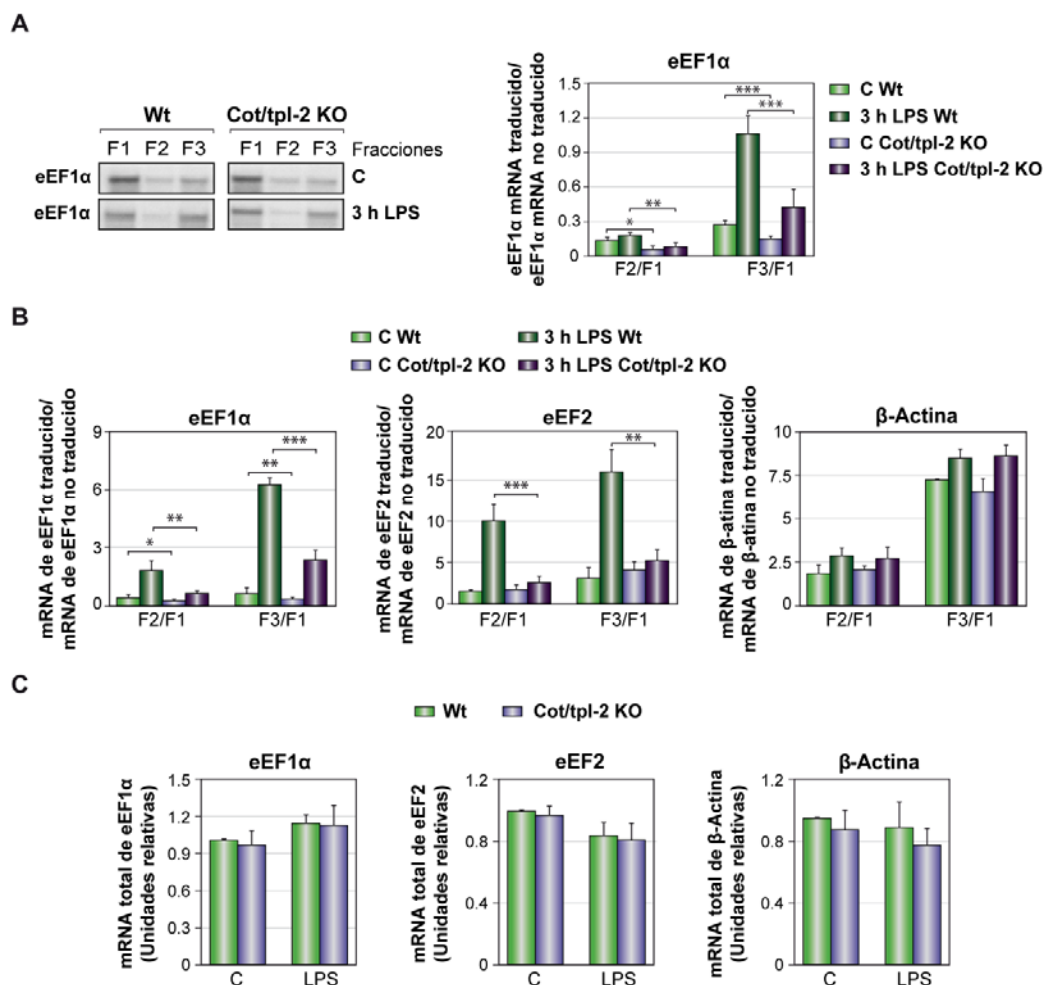


**Figura 22. Perfiles de polisomas de macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO en respuesta a LPS.**

Extractos celulares de macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO controles y estimulados con LPS (3 horas) (300 ng/ml) se dividieron mediante un gradiente de sacarosa en 3 fracciones para su posterior análisis: la fracción 1 (F1) contiene el mRNA que no está asociado a polisomas, la fracción 2 (F2) contiene el mRNA asociado a polisomas de bajo peso molecular y la fracción 3 (F3) contiene el mRNA asociado a polisomas de alto peso molecular. Se muestra un perfil de polisomas representativo de los 5 independientes realizados.



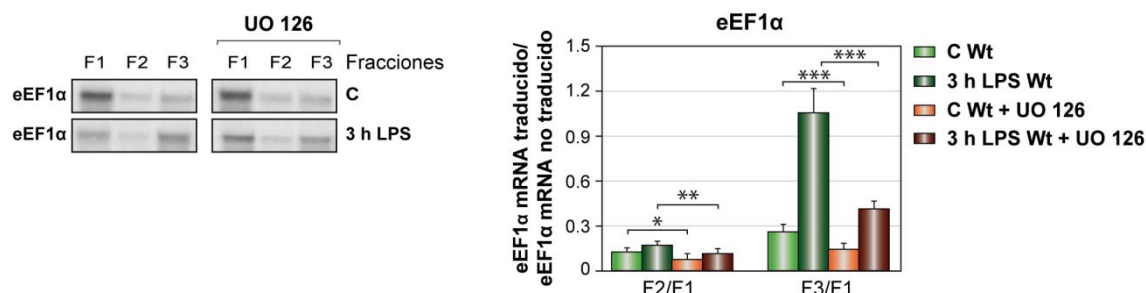
La traducción de los 5' TOP mRNAs, que codifican para proteínas de la maquinaria de traducción celular, es Cap-dependiente y es muy sensible a la activación de mTORC1 (85). Por lo que decidimos analizar si la capacidad de Cot/tpl-2 de activar mTORC1 y la traducción de mRNAs Cap-dependiente, correlaciona con la inducción de la traducción de estos mRNAs. En primer lugar, analizamos el reclutamiento del factor de elongación eEF1 $\alpha$  en las fracciones de polisomas en respuesta a la estimulación con LPS mediante Northern blot. Los resultados demuestran que a las 3 horas de estimulación con LPS se induce el reclutamiento de eEF1 $\alpha$  en la fracción de polisomas de alto peso molecular (F3) en respuesta a LPS tanto en los macrófagos Wt como en los macrófagos Cot/tpl-2 KO. Sin embargo, el reclutamiento de eEF1 $\alpha$  en la fracción de polisomas de alto peso molecular (F3) en respuesta a LPS, es significativamente menor en los macrófagos Cot/tpl-2 KO (Figura 23A). Obtuvimos resultados muy similares al analizar el reclutamiento del mRNA de eEF1 $\alpha$  en las fracciones de polisomas mediante RT-PCR cuantitativa (Figura 23B). Para determinar si la capacidad de Cot/tpl-2 de inducir el reclutamiento de mRNA de eEF1 $\alpha$  en las fracciones de polisomas es específico para este transcrito o también se observa en otros 5' TOP mRNAs, analizamos el reclutamiento en polisomas de otro 5' TOP mRNA, el factor de elongación eEF2, en respuesta a LPS mediante RT-PCR cuantitativa. Los resultados demuestran que en respuesta a LPS, el mRNA de eEF2 está localizado en las dos fracciones de polisomas, la de bajo peso molecular (F2) y la de alto peso molecular (F3) en los macrófagos BMDM Wt. Sin embargo, con la deficiencia de Cot/tpl-2 prácticamente se inhibe el reclutamiento de eEF2 en las fracciones de polisomas en respuesta a LPS (Figura 23B). Por otro lado, el mRNA de  $\beta$ -Actina que es traducido constitutivamente (122), está reclutado en la fracción de polisomas de alto peso molecular (F3) tanto en células sin estimular como estimuladas con LPS, y no está afectado por la deficiencia de Cot/tpl-2 (Figura 23B). Los niveles totales de mRNA de eEF1 $\alpha$ , eEF2 y  $\beta$ -Actina no se modifican ni tras la estimulación con LPS ni con la deficiencia de Cot/tpl-2 (Figura 23C).



**Figura 23. Cot/tpl-2 estimula el reclutamiento de los 5' TOP mRNAs eEF1α y eEF2 en las fracciones de polisomas.** **A)** Extractos de macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO, controles y estimulados con LPS (300 ng/ml) durante 3 horas, se dividieron en 3 fracciones mediante un gradiente de sacarosa: la fracción 1 (F1) contiene el mRNA que no está asociado a polisomas, la fracción 2 (F2) contiene el mRNA asociado a polisomas de bajo peso molecular y la fracción 3 (F3) contiene el mRNA asociado a polisomas de alto peso molecular. Posteriormente, los niveles de mRNA de eEF1α de cada una de las fracciones se analizaron mediante Northern blot. Se muestra un experimento representativo de los 5 experimentos independientes realizados. La gráfica de la derecha representa la media + SD del ratio de mRNA de eEF1α de las fracciones de polisomas de bajo y alto peso molecular (F2 y F3 respectivamente) con respecto a la fracción que no contiene polisomas (F1) en macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO, controles y estimulados con LPS (300 ng/ml) durante 3 horas, de 5 experimentos independientes realizados. **B)** Se muestra la media + SD del ratio de mRNA de eEF1α, eEF2 y β-Actina de las fracciones de polisomas de bajo y alto peso molecular (F2 y F3 respectivamente) con respecto a la fracción que no contiene polisomas (F1), en macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO, controles y estimulados con LPS (300 ng/ml) durante 3 horas, de 5 experimentos independientes, determinado mediante RT-PCR cuantitativa. **A-B)** Los datos han sido analizados con el test t de student ( $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*). **C)** Las gráficas representan la media + SD de los niveles totales de mRNA de eEF1α, eEF2 y β-Actina en macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO, controles y estimulados con LPS (300 ng/ml) durante 3 horas, de 5 experimentos independientes, determinados mediante RT-PCR cuantitativa. Los niveles de expresión de los diferentes transcritos se normalizaron respecto a los niveles de mRNA r18S en cada ensayo. Se ha asignado el valor arbitrario de 1 al Wt a tiempo cero.



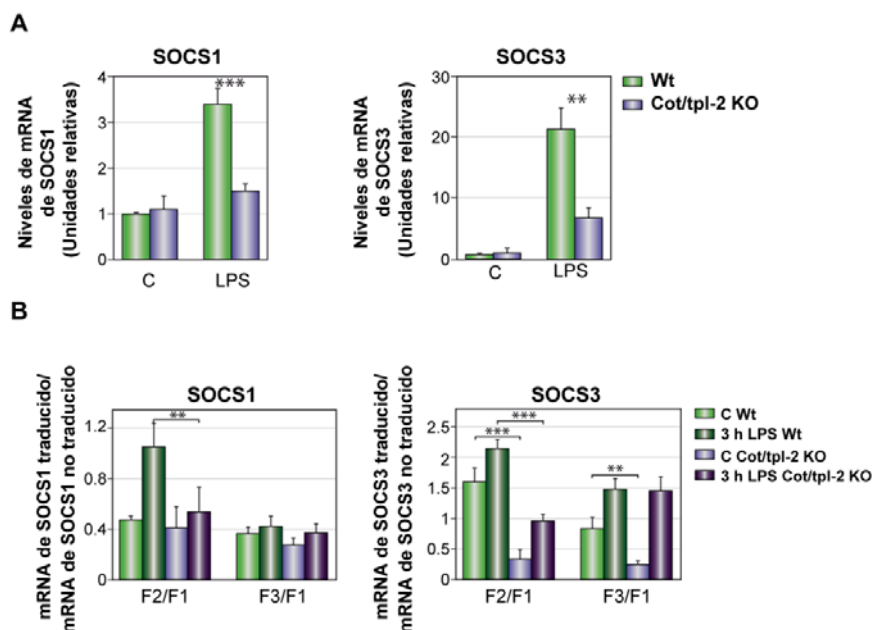
Para determinar si la capacidad de Cot/tpl-2 de inducir la traducción del 5' TOP mRNA eEF1 $\alpha$  se debe a su capacidad de modular Erk1/2, pre-incubamos los macrófagos BMDM con el inhibidor de MKK1/2, UO 126, y analizamos el reclutamiento del mRNA de eEF1 $\alpha$  en las fracciones de polisomas mediante Northern blot. Los resultados demuestran que la inhibición de Erk1/2 reprime el reclutamiento de este mRNA en la fracción de polisomas de alto peso molecular (F3) (Figura 24).



**Figura 24. El tratamiento con UO 126 reprime el reclutamiento de eEF1 $\alpha$  en polisomas en macrófagos BMDM Wt estimulados con LPS.** Macrófagos BMDM Wt se pre-incubaron con el inhibidor de MKK1/2, UO 126 (10  $\mu$ M), y se estimularon o no durante 3 horas con LPS (300 ng/ml). A continuación, los extractos se dividieron en 3 fracciones mediante un gradiente de sacarosa: la fracción 1 (F1) contiene el mRNA que no está asociado a polisomas, la fracción 2 (F2) contiene el mRNA asociado a polisomas de bajo peso molecular y la fracción 3 (F3) contiene mRNA asociado a polisomas de alto peso molecular. Posteriormente, los niveles de mRNA de eEF1 $\alpha$  de cada una de las fracciones se analizaron mediante Northern blot. Se muestra un experimento representativo de los 3 experimentos independientes realizados. La gráfica de la derecha representa la media + SD del ratio de mRNA de eEF1 $\alpha$  de las fracciones de polisomas de bajo y alto peso molecular (F2 y F3 respectivamente) con respecto a la fracción que no contiene polisomas (F1) en macrófagos Wt sin tratar y tratados con UO 126 (10  $\mu$ M), y estimulados o no con LPS (300 ng/ml) durante 3 horas, de 3 experimentos independientes, determinado mediante RT-PCR cuantitativa.

## 9. Cot/tpl-2 induce la traducción de proteínas involucradas en la señalización intracelular mediada por LPS en macrófagos.

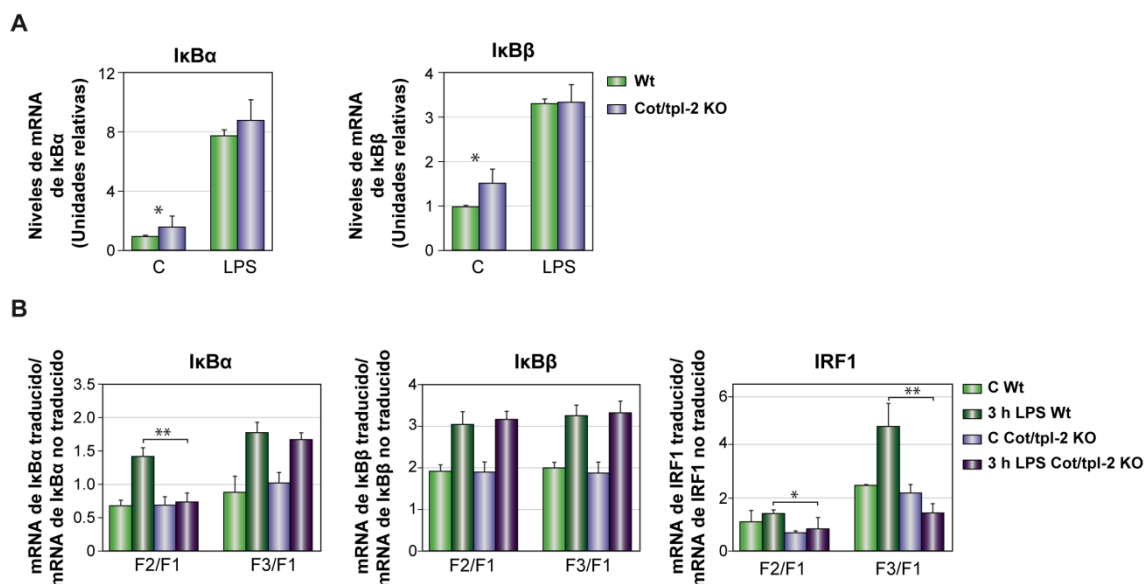
Está descrito que en macrófagos la traducción del supresor de la señalización mediada por TLRs y citoquinas, SOCS1, es Cap-dependiente (48). El análisis de los niveles de mRNA de SOCS1 y SOCS3 en macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO reveló que Cot/tpl-2 induce tanto la expresión de sus niveles de mRNA total (Figura 25A), como el reclutamiento de estos mRNAs en las fracciones de polisomas en respuesta a LPS (Figura 25B).



**Figura 25. Cot/tpl-2 activa la transcripción y traducción de SOCS1 y SOCS3 en macrófagos estimulados con LPS. A)** Se muestra la media + SD de los niveles totales de mRNA de SOCS1 y SOCS3 de macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO, controles y estimulados con LPS (300 ng/ml) durante 3 horas, de 5 experimentos independientes determinados mediante RT-PCR cuantitativa. Los niveles de expresión de cada transcrito se normalizaron respecto a los niveles de rRNA 18S. Se ha asignado el valor arbitrario de 1 al Wt a tiempo cero. **B)** Los extractos de macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO, controles y estimulados con LPS (300 ng/ml) durante 3 horas, se dividieron en 3 fracciones mediante un gradiente de sacarosa: la fracción 1 (F1) contiene el mRNA que no está asociado a polisomas, la fracción 2 (F2) contiene el mRNA asociado a polisomas de bajo peso molecular y la fracción 3 (F3) contiene el mRNA asociado a polisomas de alto peso molecular. Las gráficas muestran la media + SD del ratio de mRNA de SOCS1 y SOCS3 de las fracciones de polisomas de bajo y alto peso molecular (F2 y F3 respectivamente) respecto al mRNA de SOCS1 y SOCS3 de la fracción que no contiene polisomas (F1) en los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO, controles y estimulados con LPS (300 ng/ml) durante 3 horas, de 5 experimentos independientes, determinado mediante RT-PCR cuantitativa. **A-B)** Los datos han sido analizados con el test t de student ( $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*)

Habíamos observado previamente que los macrófagos Cot/tpl-2 KO presentan una menor recuperación de los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  en respuesta a LPS (Figura 8, página 67). Sin embargo, los niveles similares de mRNA total de I $\kappa$ B $\alpha$  en los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO tras la estimulación con LPS no explican la menor recuperación de I $\kappa$ B $\alpha$  en los macrófagos Cot/tpl-2 KO (Figura 26A). El análisis de la distribución del mRNA de I $\kappa$ B $\alpha$  en las distintas fracciones de polisomas de macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO estimulados con LPS demuestran que la deficiencia de Cot/tpl-2 inhibe en el reclutamiento de mRNA de I $\kappa$ B $\alpha$  en la fracción de polisomas de bajo peso molecular (F2) (Figura 26B), indicando que Cot/tpl-2 activa la traducción de este transcrito. Por otro lado, ni los niveles de mRNA total de I $\kappa$ B $\beta$ , ni el reclutamiento de I $\kappa$ B $\beta$  en las

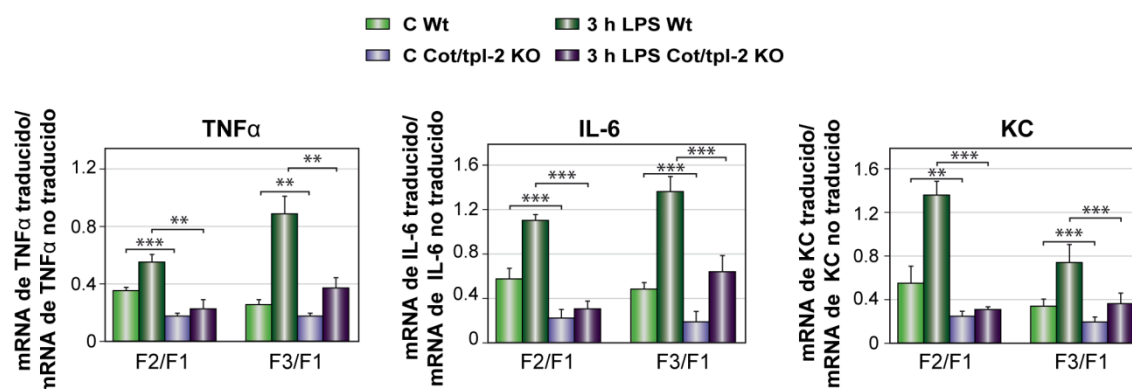
fracciones de polisomas en respuesta a LPS se ve modificado en macrófagos BMDM por la deficiencia de Cot/tpl-2 (Figura 26A-B). También habíamos observado que los macrófagos Cot/tpl-2 KO presentan aproximadamente 8 veces más mRNA de IRF1 que los macrófagos Wt tras 3 horas de estimulación con LPS (Figura 7, página 66). No obstante, los macrófagos Cot/tpl-2 KO sólo inducen aproximadamente 2 veces más nivel de proteína de IRF1 que los macrófagos Wt tras la estimulación con LPS (Figura 6, página 65). El análisis del mRNA de IRF1 reclutado en las fracciones de polisomas revela que los macrófagos Cot/tpl-2 KO presentan un menor reclutamiento de este transcrito en las fracciones de polisomas que los macrófagos Wt en respuesta a LPS (Figura 26B), lo que puede explicar la diferencia en las veces de inducción de IRF1 a nivel de mRNA y de proteína entre macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO en respuesta a LPS.



**Figura 26. Cot/tpl-2 induce la traducción de IRF1 y de IκBα en respuesta a LPS.** **A)** Se muestra la media + SD de los niveles totales de mRNA de IκBα y IκBβ de macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO, controles y estimulados con LPS (300 ng/ml) durante 3 horas, de 5 experimentos independientes, determinados mediante RT-PCR cuantitativa. Los niveles de expresión de cada transcrito se normalizaron respecto al rRNA 18S. Se ha asignado el valor arbitrario de 1 al Wt a tiempo cero. **B)** Extractos de macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO, controles y estimulados con LPS (300 ng/ml) durante 3 horas, se dividieron en 3 fracciones mediante un gradiente de sacarosa: la fracción 1 (F1) contiene el mRNA que no está asociado a polisomas, la fracción 2 (F2) contiene el mRNA asociado a polisomas de bajo peso molecular y la fracción 3 (F3) contiene mRNA asociado a polisomas de alto peso molecular. Las gráficas muestran la media + SD del ratio de mRNA de IκBα, IκBβ e IRF1 de las fracciones de polisomas de bajo y alto peso molecular (F2 y F3 respectivamente) respecto al mRNA de IκBα, IκBβ e IRF1 de la fracción que no contiene polisomas (F1) en los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO, controles y estimulados con LPS (300 ng/ml) durante 3 horas, de 5 experimentos independientes, determinado mediante RT-PCR cuantitativa. **A-B)** Los datos han sido analizados con el test t de student ( $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*).

## 10. Cot/tpl-2 induce la expresión de los mediadores inflamatorios TNF $\alpha$ , IL-6 y KC en macrófagos BMDM

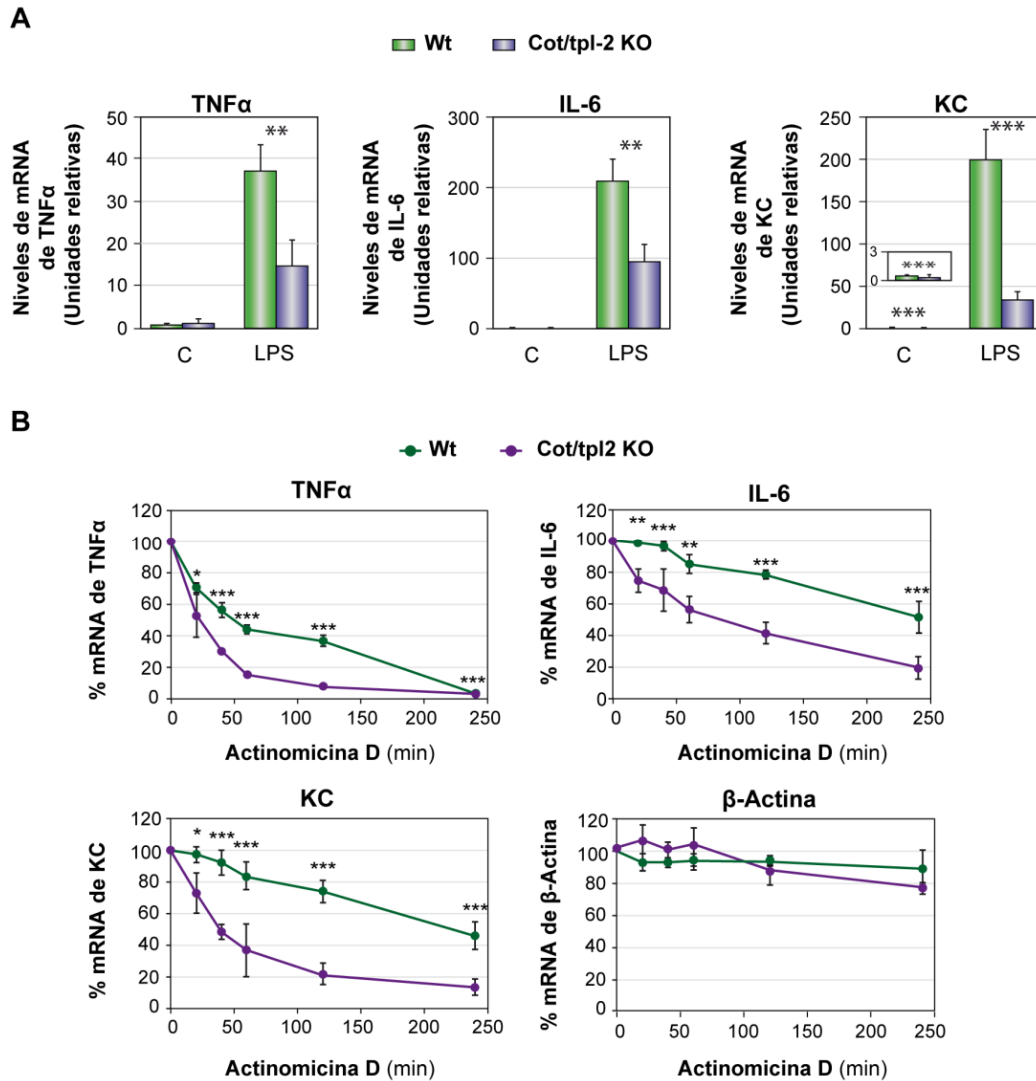
Se ha descrito que Cot/tpl-2 controla la producción de TNF $\alpha$  en macrófagos estimulados con LPS (30, 106). El análisis de la distribución de mRNA en las diferentes fracciones de polisomas demuestra que la deficiencia de Cot/tpl-2 en los macrófagos BMDM reduce el reclutamiento del mRNA de TNF $\alpha$  tanto en la fracción de polisomas de bajo peso molecular como en la fracción de polisomas de alto peso molecular, tras la estimulación con LPS durante 3 horas (Figura 27). Asimismo, el reclutamiento de mRNA de otros dos mediadores inflamatorios, la citoquina IL-6 y la quimioquina KC, está también disminuido en las dos fracciones de polisomas (F2 y F3) en los macrófagos BMDM Cot/tpl-2 KO en comparación con los macrófagos BMDM Wt (Figura 27).



**Figura 27. Cot/tpl-2 induce la traducción de los mensajeros de TNF $\alpha$ , IL-6 y KC.** Extractos de macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO, controles y estimulados con LPS (300 ng/ml) durante 3 horas, se dividieron en 3 fracciones mediante un gradiente de sacarosa: la fracción 1 (F1) contiene el mRNA que no está asociado a polisomas, la fracción 2 (F2) contiene el mRNA asociado a polisomas de bajo peso molecular y la fracción 3 (F3) contiene mRNA asociado a polisomas de alto peso molecular. Las gráficas muestran la media + SD del ratio de mRNA de TNF $\alpha$ , IL-6 y KC de las fracciones de polisomas de bajo y alto peso molecular (F2 y F3 respectivamente) con respecto al mRNA de TNF $\alpha$ , IL-6 y KC de la fracción que no contiene polisomas (F1) en los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO, controles y estimulados con LPS (300 ng/ml) durante 3 horas, de 5 experimentos independientes, determinado mediante RT-PCR. Los datos han sido analizados con el test t de student ( $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*).

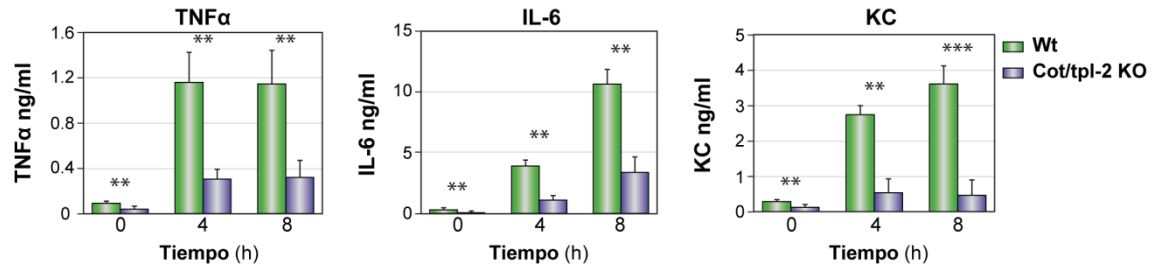
Además, la deficiencia de Cot/tpl-2 también disminuye los niveles totales de mRNA de TNF $\alpha$  (106), IL-6 y KC (Figura 28A). Para determinar si Cot/tpl-2 induce una mayor estabilidad de estos transcritos en respuesta a LPS, los macrófagos BMDM Cot/tpl-2 KO y Wt se estimularon durante 3 horas con LPS para inducir su expresión y posteriormente se trataron con Actinomicina D para bloquear la transcripción. La degradación de los mensajeros de TNF $\alpha$ , IL-6 y KC tras la adición de Actinomicina D es más rápida en los macrófagos Cot/tpl-2 KO que en los macrófagos Wt (Figura 28B).

Estos datos indican que Cot/tpl-2 estabiliza el mRNA de TNF $\alpha$ , IL-6 y KC, incrementando la vida media del mensajero de TNF $\alpha$  y de IL-6 en 2.5 veces aproximadamente y del mensajero de KC en 5 veces aproximadamente, mientras que la vida media del mensajero de  $\beta$ -Actina no está modificada por la deficiencia de Cot/tpl-2 (Figura 28A).



**Figura 28. Cot/tpl-2 incrementa la estabilidad de los transcritos de TNF $\alpha$ , IL-6 y KC en macrófagos BMDM en respuesta a LPS. A)** Se muestra la media + SD de los niveles totales de TNF $\alpha$ , IL-6 y KC de macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO, controles y estimulados con LPS (300 ng/ml) durante 3 horas, de 5 experimentos independientes, determinados mediante RT-PCR cuantitativa. Los niveles de expresión de cada transcrito se normalizaron respecto a los niveles de rRNA 18S. Se ha asignado el valor arbitrario de 1 al Wt a tiempo cero. **B)** Macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO se estimularon durante 3 horas con LPS (300 ng/ml), se incubaron con Actinomicina D (5 ng/ml) y los niveles de mRNA a los tiempos indicados de incubación con Actinomicina D se analizaron mediante RT-PCR cuantitativa. Los niveles de mRNA se normalizaron respecto a los niveles de r18S en cada ensayo. Las gráficas representan la media + SD de 3 experimentos independientes realizados, dando el valor 100% a los niveles de los transcritos tras las 3 horas de estimulación con LPS. **A-B)** Los datos han sido analizados con el test t de student ( $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*).

En correlación con la capacidad de Cot/tpl-2 de inducir la estabilidad y la traducción de los transcritos TNF $\alpha$ , IL-6 y KC, la secreción de TNF $\alpha$  (30, 106), IL-6 y KC al medio extracelular es mayor en los macrófagos Wt que en los macrófagos Cot/tpl-2 KO (Figura 29).



**Figura 29. Cot/tpl-2 induce la producción de TNF $\alpha$ , IL-6 y KC en macrófagos BMDM en respuesta a LPS.** La concentración de TNF $\alpha$ , IL-6 y KC se ha determinado en el sobrenadante de macrófagos BMDM Wt y Cot/tpl-2 KO, controles y estimulados durante 3 y 8 horas con LPS (300 ng/ml), mediante el sistema de Luminex. Las gráficas muestran la media + SD de 3 experimentos independientes. Los datos han sido analizados con el test t de student ( $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*).





## **DISCUSIÓN**





Cot/tpl-2 se identificó en una forma truncada como una proteína oncogénica implicada en transformación celular (87). Sin embargo, con posterioridad se ha determinado que Cot/tpl-2 está involucrada fisiológicamente en el control del sistema inmune innato y adaptativo. De hecho, Cot/tpl-2 (MAP3K8) es la única MAP quinasa quinasa capaz de activar Erk1/2, a través de la activación de MKK1/2, en respuesta a la activación de la superfamilia de receptores de TLR/IL-1 y de algunos receptores de la familia de TNF $\alpha$ , incluido el receptor CD40 (16, 30, 31, 132). Así, Cot/tpl-2 activa la expresión de genes relacionados con inflamación e inmunidad como TNF $\alpha$  y COX2.

La participación de Cot/tpl-2 en la regulación de la expresión de genes relacionados con inflamación no se ha observado únicamente en células aisladas, sino que también se ha demostrado su implicación en varios modelos de inflamación *in vivo*. En este contexto, la deficiencia de Cot/tpl-2 reduce significativamente la inflamación en el modelo de pancreatitis aguda inducida por caerulina (126), y en el modelo de inflamación periférica aguda inducida por zymosan (113).

Tanto Cot/tpl-2 como MKK1/2 son unas quinasas muy específicas de sustrato. Sin embargo, Erk1/2 es capaz de fosforilar a muchos sustratos en respuesta a diversas señales extracelulares, regulando múltiples y muy distintas funciones celulares. Cot/tpl-2 y las distintas proteínas Raf (MAP3K1) comparten como sustrato a MKK1/2, pero la inhibición de Cot/tpl-2 no altera la activación de Erk1/2 por Raf en respuesta a estímulos proliferativos. Por lo que en los últimos años, Cot/tpl-2 ha emergido como una diana atractiva para el desarrollo de drogas anti-inflamatorias y varios grupos y compañías están desarrollando nuevos compuestos que inhiben su actividad en procesos inflamatorios (18, 20, 37).

Cot/tpl-2 se expresa en múltiples tejidos (92); pero es en determinados tipos celulares como células epiteliales, células endoteliales y especialmente en macrófagos donde presenta una expresión mayor.

En esta Tesis Doctoral hemos estudiado como Cot/tpl-2-MKK1/2-Erk1/2 regula la señalización intracelular inducida tras la estimulación de los TLRs y su implicación en la expresión de genes relacionados con el proceso de activación de los macrófagos.

## **1. Regulación de las distintas vías de señalización intracelular inducidas en respuesta a la estimulación de los TLRs por Cot/tpl-2-MKK1/2-Erk1/2**

La estimulación de los distintos TLRs por PAMPs como el LPS en los macrófagos, induce la activación de señales intracelulares que modifican el estado de activación de estas células. Los experimentos realizados con macrófagos aislados de ratones Wt y Cot/tpl-2 KO en respuesta a LPS demuestran que, tal y como está descrito, la proteína Cot/tpl-2 es necesaria para la activación de la MAP quinasa Erk1/2, pero no para la activación de las MAP quinasas JNK1/2 y p38 $\alpha$  en respuesta a LPS (59, 106, 132). Sin embargo, los macrófagos deficientes en Cot/tpl-2 presentan una fosforilación más sostenida en el tiempo de p38 $\alpha$  y JNK1/2 en respuesta a LPS. Por otro lado, se ha descrito que la deficiencia de Cot/tpl-2 disminuye la fosforilación de p38 $\alpha$  y JNK1/2 en respuesta a la estimulación de fibroblastos embrionarios por TNF $\alpha$  (25). Estos datos demuestran que la capacidad de Cot/tpl-2 de regular el estado de fosforilación de estas quinasas es dependiente del estímulo y del tipo celular.

Además, nuestros experimentos indican que aunque los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO muestran una degradación similar de I $\kappa$ B $\alpha$  en respuesta a LPS, los macrófagos Cot/tpl-2 KO presentan una menor recuperación de los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  en comparación con los macrófagos Wt. La deficiente recuperación de los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  en ausencia de la expresión de Cot/tpl-2 se ha observado también en fibroblastos embrionarios de ratón en respuesta a TNF $\alpha$  (25). I $\kappa$ B $\alpha$  es una proteína inhibidora del factor de transcripción NF $\kappa$ B, por lo que su degradación en respuesta a LPS está relacionada con una mayor translocación del factor de transcripción NF $\kappa$ B al núcleo, induciéndose la transcripción de genes NF $\kappa$ B dependientes (101). Será necesario realizar futuros experimentos para corroborar si la falta de recuperación de I $\kappa$ B $\alpha$  en respuesta a LPS induce una mayor activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B.

La capacidad de los distintos TLRs de inducir una respuesta específica en respuesta a diferentes patrones moleculares asociados a patógenos, se debe a su capacidad de reclutar distintos adaptadores que inducen una respuesta inmune determinada (1, 61). El receptor TLR4 activado por LPS, es el único receptor que recluta tanto al adaptador MyD88 como al adaptador TRIF. El TLR3 es el único receptor que no recluta al adaptador MyD88 pero recluta al adaptador TRIF, mientras que todos los demás TLRs reclutan al adaptador MyD88 (1, 61). Para determinar si la capacidad de Cot/tpl-2 de regular la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  es dependiente del reclutamiento específico de uno de estos dos adaptadores, decimos analizar como Cot/tpl-2 modula la expresión de esta proteína en respuesta a otros TLRs. La

estimulación del TLR3 por poly I:C o del TLR2/6 por zymosan en macrófagos Cot/tpl-2 KO y Wt demostraron que la capacidad de Cot/tpl-2 de inducir los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  es independiente del adaptador (TRIF o MyD88) que transmita la señal como consecuencia de la activación de un TLR específico.

La capacidad del TLR4 y del TLR3 de reclutar al adaptador TRIF induce la translocación del factor de transcripción IRF3 al núcleo activando la producción de IFN $\beta$  (135). Recientemente, se ha demostrado que los ratones deficientes en Cot/tpl-2 inducen una mayor producción de IFN $\beta$  en respuesta a LPS que los ratones Wt, debido a la deficiencia en la activación del factor de transcripción c-fos por Erk1/2 (59, 136). Por otro lado, se ha determinado que la producción y posterior secreción de los distintos IFNs en respuesta a LPS induce la fosforilación de STAT1 (120). Nuestros experimentos demuestran que la deficiencia de Cot/tpl-2 induce una mayor fosforilación de STAT1 a las 4 h de estimulación con LPS que los macrófagos Wt, lo que correlaciona con la mayor producción de IFN $\beta$ . Además, nuestros datos indican que la deficiencia de Cot/tpl-2 incrementa la producción de IFN $\beta$  sin aumentar la translocación al núcleo del factor de transcripción IRF3 en macrófagos estimulados con LPS. En este contexto, se ha determinado que los macrófagos deficientes en NF $\kappa$ B1 también presentan mayor fosforilación de STAT1 que los macrófagos Wt en respuesta a LPS (136). En estos macrófagos, la expresión de Cot/tpl-2 es indetectable debido a que no está protegida de su degradación vía proteasoma. Asimismo, Cot/tpl-2 regula la fosforilación de STAT1 tras la activación del TLR3. Sin embargo, la activación del TLR2/6, que no activa IRF3, apenas incrementa la fosforilación de STAT1 ni en los macrófagos Wt ni en los macrófagos Cot/tpl-2 KO.

Está establecido que la vía de señalización de PI3K-Akt activada tras la estimulación de los TLRs, es un regulador negativo de la fosforilación de las MAP quinasas p38 $\alpha$  y JNK1/2 e induce la expresión I $\kappa$ B $\alpha$  (36, 50, 134). Los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral demuestran que la vía de señalización Cot/tpl-2-MKK1/2-Erk1/2 reprime la activación Akt en macrófagos estimulados con LPS.

La quinasa PI3K fosforila y activa a PDK1, que a su vez activa a Akt mediante fosforilación en el bucle de activación, en el residuo T308 (80). La deficiencia de Cot/tpl-2 en macrófagos no afecta a la fosforilación de Akt en T308, indicando que Cot/tpl-2 no regula la activación de PI3K en macrófagos estimulados con LPS. La fosforilación de Akt en T308 permite que mTORC2 subsecuentemente catalice la incorporación de un segundo fosfato en Akt, en el residuo S473, induciendo así su completa activación (49). Los macrófagos Cot/tpl-2 KO presentan una fosforilación de

Akt en S473 deficiente en comparación con los macrófagos Wt en respuesta a LPS. En este contexto, hemos determinado que la fosforilación de SGK1 en S422, otra diana de mTORC2 (41), también está reducida en los macrófagos Cot/tpl-2 KO en respuesta a LPS. Por el momento se desconoce el mecanismo por el cual el complejo mTORC2 se activa en respuesta a distintas señales celulares. Nuestros datos sugieren que Cot/tpl-2 puede mediar la activación de este complejo en respuesta a la estimulación de TLRs en macrófagos. Serán necesarios futuros experimentos para determinar el mecanismo por el cual Cot/tpl-2 podría regular la activación de mTORC2.

La fosforilación de Akt en S473 es necesaria junto con la fosforilación en T308 para que Akt fosforile a determinados sustratos, como FOXO1 (49). En concordancia, los macrófagos deficientes en Cot/tpl-2 presentan menor fosforilación de FOXO1 en T24 en respuesta a LPS. Por otro lado, la fosforilación de Akt en T308 es suficiente para que Akt fosforile a TSC2 en el residuo S939 inhibiendo así el complejo TSC1-TSC2 y activando a mTORC1 (49). Así, los macrófagos Cot/tpl-2 KO sólo muestran una ligera reducción del 20% en la fosforilación de TSC2 en S939 a partir de los 90 minutos de estimulación con LPS. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que en respuesta a LPS los macrófagos Cot/tpl-2 KO presentan una fosforilación reducida de las dianas directas de mTORC1: 4E-BP1 en S65 y S6K1 en T389.

La activación de mTORC1 está también regulada por la vía Raf-MKK1/2-Erk1/2 mediante su capacidad de activar a la quinasa RSK (3, 80). RSK fosforila a TSC2 en el residuo S1798, inhibiendo al complejo TSC1-TSC2 y por tanto, activando al complejo mTORC1 (3). Nuestros resultados indican que los macrófagos deficientes en Cot/tpl-2 muestran una menor activación de RSK en respuesta a LPS y una menor fosforilación de TSC2 en S1798. Además, tanto RSK como S6K1, diana directa de mTORC1, regulan también la fosforilación de la proteína de la subunidad pequeña del ribosoma S6 en S235/236 y de la quinasa del factor de elongación eEF2, eEF2K, en S366 (3). La deficiencia en la fosforilación de RSK y S6K1 en los macrófagos Cot/tpl-2 KO correlaciona con una menor fosforilación de sus sustratos eEF2K y S6. Estos datos indican que Cot/tpl-2 modula la activación de mTORC1 y de sus sustratos vía Erk1/2, a través de la activación de RSK, y no vía Akt. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que Cot/tpl-2 también inhiba al complejo TSC1-TSC2 mediante la fosforilación directa de TSC2 en S664 por Erk1/2, y subsecuentemente aumente la actividad de mTORC1 (79).

Para analizar si la deficiencia en la fosforilación de Akt S473, 4E-BP1, S6K1, eEF2K y S6 en los macrófagos Cot/tpl-2 KO se debe a la desestabilización del

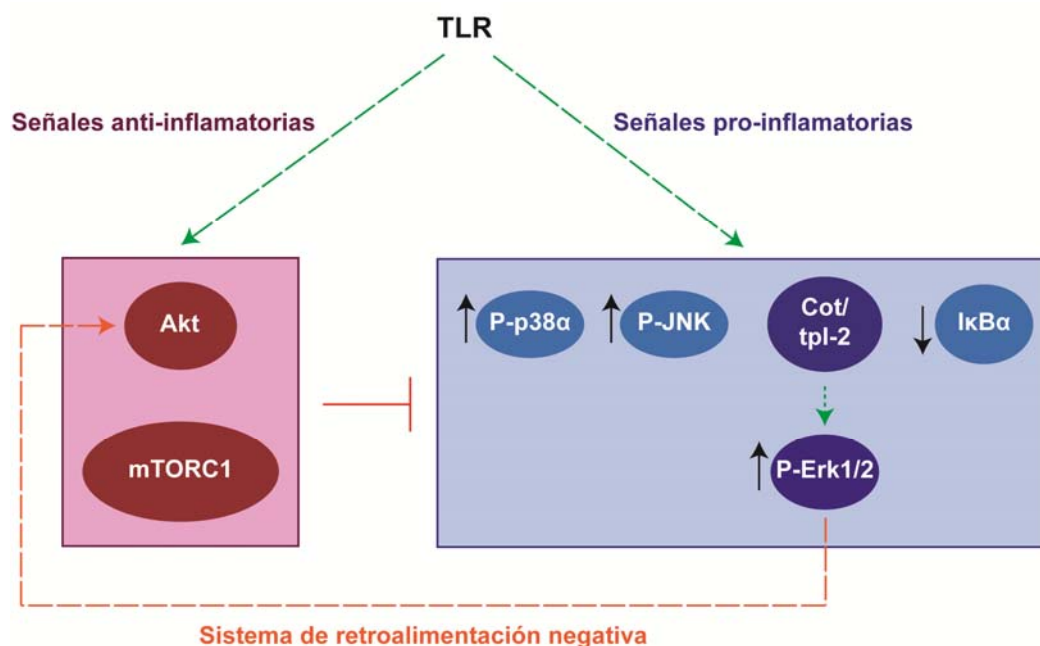
complejo que forma Cot/tpl-2 al menos con NFκB y ABIN-2 o a la falta de actividad de Cot/tpl-2, decidimos analizar estas vías de señalización en macrófagos que expresan la proteína Cot/tpl-2 pero con una mutación puntual en la que se ha sustituido la lisina responsable de la unión de ATP (lisina 167) por arginina inhibiéndose así su actividad quinasa (macrófagos KD). La falta de activación de Erk1/2 en los macrófagos KD en respuesta a LPS, correlaciona con una disminución en la fosforilación de Akt S473, 4E-BP1, S6K1, eEF2K y S6, en respuesta a la estimulación de los macrófagos con LPS. Estos datos indican que es la actividad quinasa de Cot/tpl-2 la responsable de inducir la fosforilación de estas proteínas.

Por otro lado, resulta interesante destacar que la degradación de Cot/tpl-2 inducida por LPS presente en los ratones Wt es deficiente en los ratones Cot/tpl-2 KD. Este dato sugiere que la actividad quinasa de Cot/tpl-2 es necesaria para inducir su propia degradación vía proteasoma.

El uso de inhibidores específicos de proteínas quinasas permite determinar las vías que regulan las distintas quinasas. El inhibidor de MKK1/2, PD 0325901, nos ha permitido comprobar que la inhibición de MKK1/2 y consiguiente inhibición de la fosforilación de Erk1/2 en los macrófagos Wt, reproduce el fenotipo de los macrófagos Cot/tpl-2 KO y Cot/tpl-2 KD. La falta de fosforilación de Erk1/2 en los macrófagos tratados con PD 0325901, correlaciona con una deficiencia en la fosforilación de Akt S473, 4E-BP1, S6K1, S6 y eEF2K. Estos datos indican que Cot/tpl-2 controla la fosforilación de estas proteínas mediante su capacidad de activar Erk1/2. Asimismo, tanto la inhibición de Erk1/2 por otro inhibidor de MKK1/2, el UO 126, como la inhibición de mTORC1 por rapamicina, también inhiben la fosforilación de 4E-BP1 en macrófagos estimulados con LPS, indicando que Cot/tpl-2 media la fosforilación de 4E-BP1 a través de la activación de mTORC1 por Erk1/2.

La capacidad de Cot/tpl-2 de inducir la fosforilación de estas proteínas no es específica una vez más del tipo de adaptador reclutado tras la estimulación de un TLR específico. Cot/tpl-2 activa Erk1/2 tras la estimulación con zymosan o poly I:C, induciendo una mayor fosforilación de Akt S473, RSK, 4E-BP1, S6 y eEF2K, en respuesta a estos estímulos. Sin embargo, la deficiencia de Cot/tpl-2 no afecta a la fosforilación de Akt S473, S6K1, ni de 4E-BP1, tras la estimulación de macrófagos con IL-10, que utiliza un receptor no relacionado con los TLRs (66). Estos datos indican que la capacidad de Cot/tpl-2 de activar estas vías de señalización intracelulares es un evento específico de la activación de los TLRs.

Se ha determinado que la inhibición de la señalización de PI3K con wortmanina, que inhibe la activación de Akt y de mTORC1, induce una mayor fosforilación de JNK1/2 y p38 $\alpha$  y una menor expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  en los macrófagos Wt (36). En este contexto, la mayor fosforilación de JNK1/2 y de p38 $\alpha$ , y la menor expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  en los macrófagos Cot/tpl-2 KO correlacionan con una menor fosforilación de Akt S473 y de los sustratos de mTORC1, en comparación con los ratones Wt. Además, el tratamiento con wortmanina disminuye la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  en los macrófagos Wt estimulados con LPS pero no tiene efecto en los macrófagos Cot/tpl-2 KO, eliminándose así las diferencias en los niveles de expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  entre los macrófagos Wt y los macrófagos Cot/tpl-2 KO. Estos resultados sugieren que la fosforilación más sostenida de p38 $\alpha$ , JNK1/2 y la inhibición de la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  en macrófagos Cot/tpl-2 estimulados con LPS se debe a la capacidad de Cot/tpl-2 de regular la vía de Akt y de mTORC1. Dado que la vía de señalización de PI3K-Akt también reprime la fosforilación de Erk1/2 (50), estos datos apuntan a que la activación de Erk1/2 induce su propia inhibición mediante un mecanismo de retroalimentación negativa modulando la activación de la vía de Akt (Figura 1).



**Figura 1. Modelo propuesto de control de la vía de señalización de Akt y mTORC1 por Cot/tpl-2 en respuesta a la activación de los TLRs en macrófagos.**

## 2. Regulación de la biosíntesis de proteínas por Cot/tpl-2 en respuesta a la estimulación por LPS

En este trabajo hemos descrito que Cot/tpl-2 regula la fosforilación de proteínas diana de mTORC1 mediante su capacidad de activar a RSK. mTORC1 es el principal complejo que integra la activación de la traducción de proteínas Cap-dependiente en respuesta a señales extracelulares mediante la fosforilación de proteínas involucradas en la regulación de este proceso (137).

El paso limitante de la traducción es la iniciación, donde el ribosoma se une al mRNA y busca el codón de inicio. La mayoría de los mRNAs eucarióticos poseen una estructura denominada Cap en el extremo 5' del mRNA. Para que se inicie la traducción es necesario que la proteína inhibidora 4E-BP1 se disocie de eIF4E, la proteína de unión a Cap, formándose el complejo de iniciación de la traducción activo eIF4F necesario para la unión del ribosoma al mRNA. La principal diana de mTORC1 implicada en la regulación de la traducción de proteínas Cap-dependiente es 4E-BP1. La fosforilación de 4E-BP1 por mTORC1 permite que 4E-BP1 se disocie del factor de iniciación eIF4E, favoreciendo así la iniciación de la biosíntesis de proteínas Cap-dependiente (80, 102, 122). Como ya hemos descrito, nuestros resultados demuestran que los macrófagos Cot/tpl-2 KO presentan una deficiencia en la fosforilación de 4E-BP1 en S65 inducida por LPS en comparación con los macrófagos Wt. Estas diferencias no se deben a variaciones en los niveles totales de 4E-BP1. La deficiencia en la fosforilación de 4E-BP1 en los macrófagos Cot/tpl-2 KO afecta severamente a la disociación del complejo eIF4E-4E-BP1 en respuesta a LPS en estos macrófagos. Hay que resaltar que en células sin estimular, los macrófagos Cot/tpl-2 KO ya presentan una menor fosforilación de 4E-BP1 y una mayor asociación de eIF4E y 4E-BP1, y que estas diferencias se incrementan significativamente en respuesta a LPS.

Además, hemos determinado que Cot/tpl-2 controla la fosforilación de S6 y eEF2K, dianas de S6K1 y RSK. Estas proteínas están también involucradas en la activación de la traducción de mRNAs. Por un lado, la fosforilación de S6, proteína que forma parte de la subunidad pequeña del ribosoma 40S, está relacionada con una asociación más eficiente del ribosoma al complejo de pre-iniciación de la traducción (108). Por otro lado, la fosforilación e inhibición de la quinasa eEF2K, impide que esta quinasa fosforile e inhiba al factor de elongación eEF2, activándose por tanto no sólo la iniciación de la traducción, sino también la elongación (102).

Asimismo, la fosforilación de la proteína de unión a Cap eIF4E en S209 por MNK, que es dependiente de la activación de las quinasas Erk1/2 y p38 $\alpha$  (124), está



también disminuida en los macrófagos Cot/tpl-2 KO estimulados con LPS. Sin embargo, existen discrepancias acerca de si está fosforilación activa, inhibe o no tiene ningún efecto en la traducción Cap-dependiente (122). Nuestros experimentos indican que la actividad quinasa de Cot/tpl-2 controla la fosforilación de eIF4E mediante su capacidad de activar Erk1/2, en respuesta a la estimulación de los receptores TLR4, TLR3 y TLR2/6.

Tras el análisis de la eficiencia de la traducción Cap-dependiente de la luciferasa de Renilla y de la traducción IRES-dependiente de la luciferasa de luciérnaga, hemos comprobado que la falta de disociación de eIF4E y 4E-BP1 en los macrófagos Cot/tpl-2 KO correlaciona con una disminución en la traducción Cap-dependiente, hecho que se hace especialmente evidente tras la estimulación con LPS. Sin embargo, la traducción IRES-dependiente, que no utiliza la estructura Cap para la unión del ribosoma (64), no se ve modificada ni por la deficiencia de Cot/tpl-2 ni por la estimulación con LPS. Además, el estudio de la eficiencia de síntesis de proteínas mediante el análisis de la incorporación de metionina y cisteína marcadas radioactivamente en <sup>35</sup>S, demuestra que Cot/tpl-2 activa la síntesis de determinadas proteínas en macrófagos estimulados con LPS.

Asimismo, hemos analizado la eficiencia de traducción mediante el estudio de los perfiles de polisomas. Los perfiles de polisomas indican cuantos ribosomas están unidos a mRNAs, y dado que el control de la traducción ocurre principalmente a nivel de la iniciación, el análisis de la carga de ribosomas de los transcritos es un buen indicador de la eficiencia de la traducción (129). Los resultados demuestran que la deficiencia de Cot/tpl-2 no modifica el perfil general de polisomas, pero si modula el reclutamiento de mRNAs específicos a ribosomas en respuesta a LPS. Estos datos correlacionan con estudios previos en los que se ha determinado que pese a que la unión de eIF4E a la estructura Cap es un factor necesario para la traducción eficiente de la mayoría de mRNAs, la disociación del complejo eIF4E-4E-BP1 sólo afecta levemente a la tasa de traducción de proteínas general de las células. De hecho, la inhibición de mTORC1 por rapamicina presenta moderados efectos sobre la tasa total de síntesis de proteínas durante periodos cortos de tiempo (102). Sin embargo, la traducción de mRNAs con estructuras secundarias complicadas en la región 5' es muy dependiente del estado de fosforilación 4E-BP1. Para la traducción eficiente de estos transcritos es necesaria la formación del complejo de iniciación activo eIF4F que tiene actividad helicasa y desenrolla las estructuras secundarias del mRNA, permitiendo que el ribosoma se una a la estructura Cap y encuentre el codón de inicio (102). En este contexto, el análisis de mRNAs específicos realizado tras el fraccionamiento de los



polisomas en un gradiente de sacarosa demuestra que en respuesta a LPS la deficiencia de Cot/tpl-2 afecta severamente a la traducción de los mensajeros de TNF $\alpha$ , IL-6 y KC, que tienen estructuras secundarias muy complicadas, sin modular la síntesis de actina, que no presenta estructuras secundarias (122) y cuya traducción es muy activa tanto en células sin estimular como estimuladas con LPS.

Además, existe una población de transcritos específicos, los denominados 5' TOP mRNAs, que son traducidos de forma Cap-dependiente y son muy sensibles a la activación del complejo mTORC1. Estos mRNAs codifican para proteínas ribosomales y proteínas que regulan la maquinaria de traducción como los factores de elongación (85). Asimismo, hemos determinado que la deficiencia de Cot/tpl-2 inhibe la traducción de los transcritos 5' TOP estudiados, los factores de elongación eEF1 $\alpha$  y eEF2, sugiriendo que Cot/tpl-2 podría modular tanto la iniciación como la elongación de la traducción. El tratamiento con UO 126, que inhibe la activación de Erk1/2, también reprime la traducción de eEF1 $\alpha$ , indicando que Cot/tpl-2 controla la traducción de este transcrito gracias a su capacidad de activar Erk1/2. Por otro lado, los niveles de mRNA totales de eEF1 $\alpha$  y eEF2 no están modulados ni por LPS ni por Cot/tpl-2.

Está descrito que la traducción del supresor de la señalización de citoquinas SOCS1 es sensible a la fosforilación de 4E-BP1 en macrófagos (48). Nuestros resultados demuestran que Cot/tpl-2 induce tanto la expresión de los niveles de mRNA totales como la traducción de SOCS1 y SOCS3 en respuesta a LPS. Dado que las proteínas SOCSs inhiben la señalización intracelular mediada por los TLRs, es posible que Cot/tpl-2 regule el estado de activación de esta vía de señalización intracelular mediante la regulación de la expresión de las proteínas SOCSs.

Por otro lado, nuestros datos demuestran que la deficiencia de Cot/tpl-2 induce una mayor expresión de los niveles totales de mRNA del factor de transcripción IRF1 en respuesta a LPS. Sin embargo, mientras que la deficiencia de Cot/tpl-2 incrementa los niveles del mRNA de IRF1 en ocho veces, sólo hay una diferencia de dos veces en los niveles de proteína. El posterior análisis de la distribución del mRNA de IRF1 en las distintas fracciones de polisomas demuestra que los macrófagos Cot/tpl-2 KO presentan una deficiencia en la traducción del mRNA de IRF1 en respuesta a LPS, lo que puede explicar la discrepancia existente entre los niveles de mRNA y de proteína de IRF1 observados por la deficiencia de Cot/tpl-2. De hecho, los macrófagos Wt tratados con wortmanina, que inhibe la traducción Cap-dependiente (43), presentan una disminución en los niveles de IRF1 tras la estimulación con LPS.

Asimismo, la recuperación de los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  tras su degradación en respuesta a LPS, está disminuida en los macrófagos Cot/tpl-2 KO. Sin embargo, la expresión de mRNA total similar en los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO no explica la mayor expresión de esta proteína. Nuestros datos demuestran que la deficiencia de Cot/tpl-2 reduce el reclutamiento de ribosomas al mRNA de I $\kappa$ B $\alpha$ . Por otro lado, ni los niveles de mensajero de I $\kappa$ B $\beta$  ni la traducción de I $\kappa$ B $\beta$ , están modificados por la ausencia de Cot/tpl-2 en respuesta a LPS. Estos datos indican que la menor expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  en los macrófagos Cot/tpl-2 KO se debe a una deficiencia en su re-síntesis, aunque no se puede descartar que también haya una mayor tasa de degradación en estos macrófagos.

Los organismos vivos requieren un control preciso de la magnitud de la respuesta inmune para defenderse de las infecciones sin dañar al huésped. La regulación de la traducción de mensajeros ya transcritos confiere a las células inmunes una ventaja estratégica, ya que se trata de una respuesta rápida que evita los lentos mecanismos de control del mRNA nucleares (transcripción, procesamiento y transporte) y además, es un mecanismo reversible mediado por fosforilación (42, 83). La vía de mTORC1 media la fosforilación de proteínas involucradas en la activación de la traducción Cap-dependiente regulando la respuesta inmune innata y adaptativa (83, 121, 133). En esta Tesis Doctoral hemos determinado un papel novedoso de Cot/tpl-2 en la activación de la vía de mTORC1 a través de Erk1/2, modulando la traducción Cap-dependiente de mediadores inflamatorios y de proteínas implicadas en maquinaria de traducción celular en macrófagos en respuesta a LPS. Estos datos indican que el control de la traducción desempeña un papel clave en la producción de citoquinas y quimioquinas durante la respuesta inmune.

### **3. Control de la estabilidad de mensajeros de mediadores inflamatorios por Cot/tpl-2 en respuesta a LPS**

En esta Tesis Doctoral hemos demostrado que Cot/tpl-2 no solo regula la eficiencia de traducción de TNF $\alpha$ , IL-6 y KC, sino que también modula los niveles totales de sus mensajeros en macrófagos en respuesta a LPS. Los niveles de mRNA totales son resultado tanto de la tasa de transcripción como de la estabilidad del mRNA (115). Nuestros datos demuestran que Cot/tpl-2 induce un aumento en la estabilidad de estos transcritos en respuesta a LPS. Estos mensajeros presentan

secuencias AREs, ricas en AU, en su región 3' no codificante que desestabilizan los transcritos (2, 115). En este contexto, se ha descrito que Cot/tpl-2 modula la expresión del mRNA de TNF $\alpha$  mediante un mecanismo en el que está implicado el elemento rico en AU presente en la región 3' de este transcrito tras la estimulación con LPS (30). Se requieren futuros estudios para elucidar si Cot/tpl-2 controla la estabilidad de estos transcritos modulando la actividad de proteínas específicas de unión a AREs o la expresión de microRNAs que regulan la estabilidad de los transcritos. Por otro lado, no se puede descartar que Cot/tpl-2 también regule la tasa de transcripción de estos mediadores inflamatorios. De hecho, una sobreexpresión de Cot/tpl-2 incrementa la transcripción de TNF $\alpha$  (6). Todos estos datos correlacionan con la mayor secreción de estos mediadores inflamatorios al medio extracelular tras la estimulación con LPS en los macrófagos Wt en comparación con los macrófagos Cot/tpl-2 KO

La regulación post-transcripcional de las citoquinas y quimioquinas es un factor crítico que determina su producción en células implicadas en la respuesta inmune (2). Todos estos datos indican que Cot/tpl-2 regula la secreción de citoquinas y quimioquinas mediante el control de modificaciones post-transcripcionales, como la estabilidad y la traducción de los transcritos, tras la estimulación de los macrófagos con LPS.

#### **4. Regulación de la activación de los macrófagos en respuesta a LPS por Cot/tpl-2**

El análisis de las poblaciones de macrófagos derivados de la médula ósea (BMDM) y peritoneales de los ratones Wt y Cot/tpl-2 KO, demuestra que Cot/tpl-2 no regula ni las poblaciones de estos macrófagos ni el grado de expresión de marcadores de superficie que indican el grado de diferenciación/activación de estos macrófagos en estado basal. Asimismo, no hay diferencias entre los ratones Wt y los ratones deficientes en Cot/tpl-2 en las poblaciones de otras células inmunes presentes en el peritoneo tras la inyección intraperitoneal de tioglicolato.

El LPS genera una respuesta inflamatoria sistémica, que induce la liberación de la molécula citotóxica óxido nítrico, como parte del sistema de defensa del huésped frente a la infección bacteriana. La principal enzima productora de óxido nítrico en macrófagos, la enzima óxido nítrico sintasa inducible o NOS2, es por tanto uno de los marcadores más importantes de la activación clásica de los macrófagos o M1 (76).

Nuestros resultados demuestran que Cot/tpl-2 inhibe la expresión de NOS2 *in vivo* en hígado y pulmón, tras la inyección sistémica de LPS. Asimismo, Cot/tpl-2 reprime la expresión de los niveles totales de mRNA de NOS2 en macrófagos. De esta forma, los macrófagos deficientes en Cot/tpl-2 presentan mayor expresión de la proteína NOS2 y consecuentemente mayor liberación de óxido nítrico en respuesta a la estimulación con LPS. Además, Cot/tpl-2 también reprime la expresión de NOS2 en respuesta a zymosan a poly I:C. En este contexto, se ha demostrado que la deficiencia de IKK- $\beta$ , que es necesaria para la activación de Cot/tpl-2, induce un aumento de la expresión de NOS2 en respuesta a LPS con respecto a los ratones Wt (132).

El análisis de la expresión de NOS2 en macrófagos Cot/tpl-2 KD muestra unos niveles muy similares a los obtenidos en los macrófagos Cot/tpl-2 KO en respuesta a LPS. Sin embargo, el aumento en la expresión de NOS2 en los macrófagos Wt pre-tratados con PD 0325901, es menor que en los macrófagos Cot/tpl-2 KO. Además, el tratamiento con wortmanina elimina las diferencias existentes en la expresión de NOS2 entre los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO en respuesta a LPS, sugiriendo que es dependiente de PI3K. Sin embargo, mientras que el pre-tratamiento con wortmanina induce un aumento de la expresión de NOS2 en los macrófagos Wt en respuesta a LPS (28), disminuye los niveles de NOS2 en los macrófagos Cot/tpl-2 KO. Estos datos indican que Cot/tpl-2 reprime la expresión de NOS2 vía Akt mediante la activación de Erk1/2; pero que se requiere un nivel basal de actividad de Erk1/2 y de PI3K para una expresión máxima de NOS2. En este sentido, es importante tener en cuenta que los inhibidores como wortmanina y PD 0325901 no sólo bloquean la inducción de la fosforilación de Akt y Erk1/2 respectivamente en respuesta a la estimulación por LPS, tal y como ocurre en los macrófagos Cot/tpl-2 KO o KD, sino que además afectan al estado de fosforilación/activación basal de estas proteínas.

Se necesitará realizar futuros experimentos para determinar como la mayor fosforilación de p38 $\alpha$  y JNK1/2, y la mayor re-síntesis de I $\kappa$ B $\alpha$  podrían contribuir individualmente a la mayor expresión de NOS2 presente en los macrófagos Cot/tpl-2 KO. De hecho, la expresión de NOS2 en macrófagos estimulados con LPS es dependiente de la actividad NF $\kappa$ B (75).

Por otro lado, Cot/tpl-2 también tiene la capacidad de modular la expresión de genes de forma independiente de la vía de Akt. El tratamiento con wortmanina no iguala los niveles de expresión de IRF1, otro marcador de la activación M1 (78), entre los macrófagos Wt y Cot/tpl-2 KO. De hecho, el tratamiento con wortmanina disminuye los niveles de IRF1 en los macrófagos Wt, posiblemente porque está inhibiendo su

traducción. Además, nuestros datos demuestran que tanto el tratamiento de los macrófagos Wt con PD 0325901 como los macrófagos Cot/tpl-2 KD, reproducen el fenotipo de los macrófagos Cot/tpl-2 KO en la expresión del factor de transcripción IRF1. Todos estos datos indican que Cot/tpl-2 controla la expresión de los niveles totales de mRNA de genes involucrados en la activación de los macrófagos de forma dependiente de su capacidad de activar Erk1/2, y en algunos casos por la capacidad que tiene Erk1/2 de regular la activación de Akt.

El IFN $\beta$  y el IFN $\gamma$  activan la fosforilación de STAT1 induciendo la expresión de NOS2 en macrófagos (29). Sin embargo, hemos demostrado que aunque los macrófagos deficientes en Cot/tpl-2 producen mayores niveles de IFN $\beta$  (59) y de IFN $\gamma$  con respecto a los macrófagos Wt, también presentan mayor expresión de NOS2 en respuesta a LPS en presencia de dosis saturantes de IFN $\beta$  o de IFN $\gamma$ , que eliminan las diferencias en el estado de fosforilación de STAT1 entre los macrófagos Wt y los macrófagos deficientes en Cot/tpl-2. De hecho, la estimulación por zymosan no muestra una inducción significativa de la fosforilación de STAT1 ni en los macrófagos Wt ni en los macrófagos Cot/tpl-2 KO y la deficiencia de Cot/tpl-2 también induce una mayor expresión de NOS2 en respuesta a este estímulo. Estos datos indican que la deficiencia de Cot/tpl-2 no induce una mayor expresión de NOS2 por su capacidad de incrementar los niveles de IFN $\beta$  o de IFN $\gamma$ , o al menos no exclusivamente. Además, STAT1 también activa la transcripción de IRF1 (93). Sin embargo, los macrófagos Cot/tpl-2 KO presentan mayor expresión de IRF1 tanto en respuesta a LPS como en respuesta a zymosan o poly I:C. Dado que el factor de transcripción IRF1 también modula la expresión de NOS2 (60), su contribución en el aumento de la expresión de NOS2, en los macrófagos deficientes en Cot/tpl-2 en respuesta a la activación de los TLRs no puede ser excluida.

La activación de la vía Jak/STAT1 por IFN $\beta$  en respuesta a LPS, es necesaria para una adecuada activación de la transcripción de algunos genes como IFN $\gamma$ , IP-10 y CCL-5 (93). Sin embargo, queda por elucidar si la mayor expresión de los niveles totales de mRNA de estas citoquinas y quimioquinas en los macrófagos Cot/tpl-2 KO se debe a la mayor fosforilación de STAT1 en estos macrófagos en respuesta a LPS.

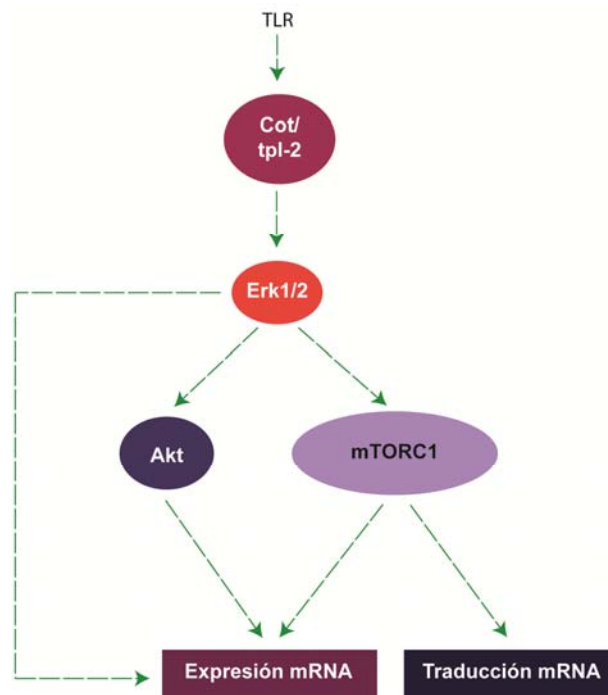
La polarización de los macrófagos hacia activación clásica, activación alternativa o desactivación, determina el tipo de respuesta de los macrófagos frente a patógenos y células malignas (78). Asimismo, estos distintos tipos de macrófagos inducen la producción de poblaciones de citoquinas diferentes, cuyo balance determina el tipo de polarización de la respuesta inmune adaptativa hacia tipo Th1,

Th2 o tolerancia (78). Recientemente, se ha propuesto que Cot/tpl-2 es un importante regulador negativo de la respuesta inmune adaptativa tipo Th1, ya que los ratones Cot/tpl-2 KO producen más IL-12 e IFN $\gamma$  y menos IL-4, en comparación con los ratones Wt, en respuesta a la activación del receptor TLR9 por CpG-ADN (116). En este sentido, nosotros también hemos demostrado que Cot/tpl-2 inhibe la expresión de otros marcadores de activación de macrófagos tipo M1 en respuesta a LPS, como la enzima NOS2, el factor de transcripción IRF1, la citoquina IFN $\gamma$  y las quimioquinas IP-10 y CCL-5.

Sin embargo, Cot/tpl-2 además de controlar negativamente la expresión de algunos genes marcadores de una activación tipo M1 en respuesta a LPS, también es necesaria para la inducción de otros genes que están implicados en la activación clásica de los macrófagos como COX2 y TNF $\alpha$ . Por un lado, la activación de Cot/tpl-2 es necesaria para la activación del factor de transcripción CREB, un regulador clave de la inducción de la transcripción del mediador inflamatorio COX2 por LPS (31). En este contexto, nuestros resultados demuestran que la actividad de Cot/tpl-2 induce la expresión de COX2 en respuesta a LPS y que Cot/tpl-2 también activa la expresión de COX2 en respuesta a zymosan y a poly I:C. El principal producto de COX2 es el mediador lipídico inmunosupresor PGE<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> controla negativamente la señalización mediada por óxido nítrico (67). El hecho de que Cot/tpl-2 regule de forma contraria la expresión de COX2 y de NOS2, sugiere que esta proteína podría jugar un papel importante en el control de la resolución del proceso inflamatorio. Por otro lado, la activación de Cot/tpl-2 es necesaria para la completa inducción de la transcripción de TNF $\alpha$  (6), para el transporte del mRNA al citosol (30) y para el procesamiento de pre-TNF $\alpha$  a su forma madura que es secretada en respuesta a LPS (106). Nuestros experimentos indican que Cot/tpl-2 también induce una mayor estabilidad del mensajero de TNF $\alpha$  y de su traducción en respuesta a LPS. Además, Cot/tpl-2 induce la producción de IL-1 $\beta$  (86). Asimismo, hemos demostrado que Cot/tpl-2 activa la expresión de otros genes típicos de una respuesta tipo M1, como la citoquina IL-6 y la quimioquina KC.

Todos estos datos demuestran que Cot/tpl-2 modula el estado de activación de los macrófagos en respuesta a la estimulación de los TLRs, mediante la activación de la expresión de algunos genes como TNF $\alpha$ , COX2, IL-1 $\beta$ , KC e IL6 y la represión de otros como IFN $\beta$ , IL-12, IFN $\gamma$ , CCL-5, IP-10, NOS2 e IRF1.


En conclusión, en esta Tesis Doctoral hemos demostrado que Cot/tpl-2-MKK1/2-Erk1/2 tiene la capacidad de modular el estado de activación de las vías intracelulares de Akt y mTORC1, así como diversos aspectos de la traducción de proteínas Cap-dependiente, tras la activación de los TLRs en los macrófagos. Nuestros datos adscriben un papel novedoso a Cot/tpl-2, ya que muestran que no sólo regula la expresión génica de mediadores inflamatorios, sino que controla también su traducción (Figura 2). Estos datos corroboran que Cot/tpl-2 es una proteína importante en inmunidad y que su actividad no puede ser remplazada por ninguna otra proteína.



**Figura 2. Modelo propuesto de control de la expresión de proteínas involucradas en el estado de activación de los macrófagos en respuesta a la activación de los TLRs por Cot/tpl-2.**







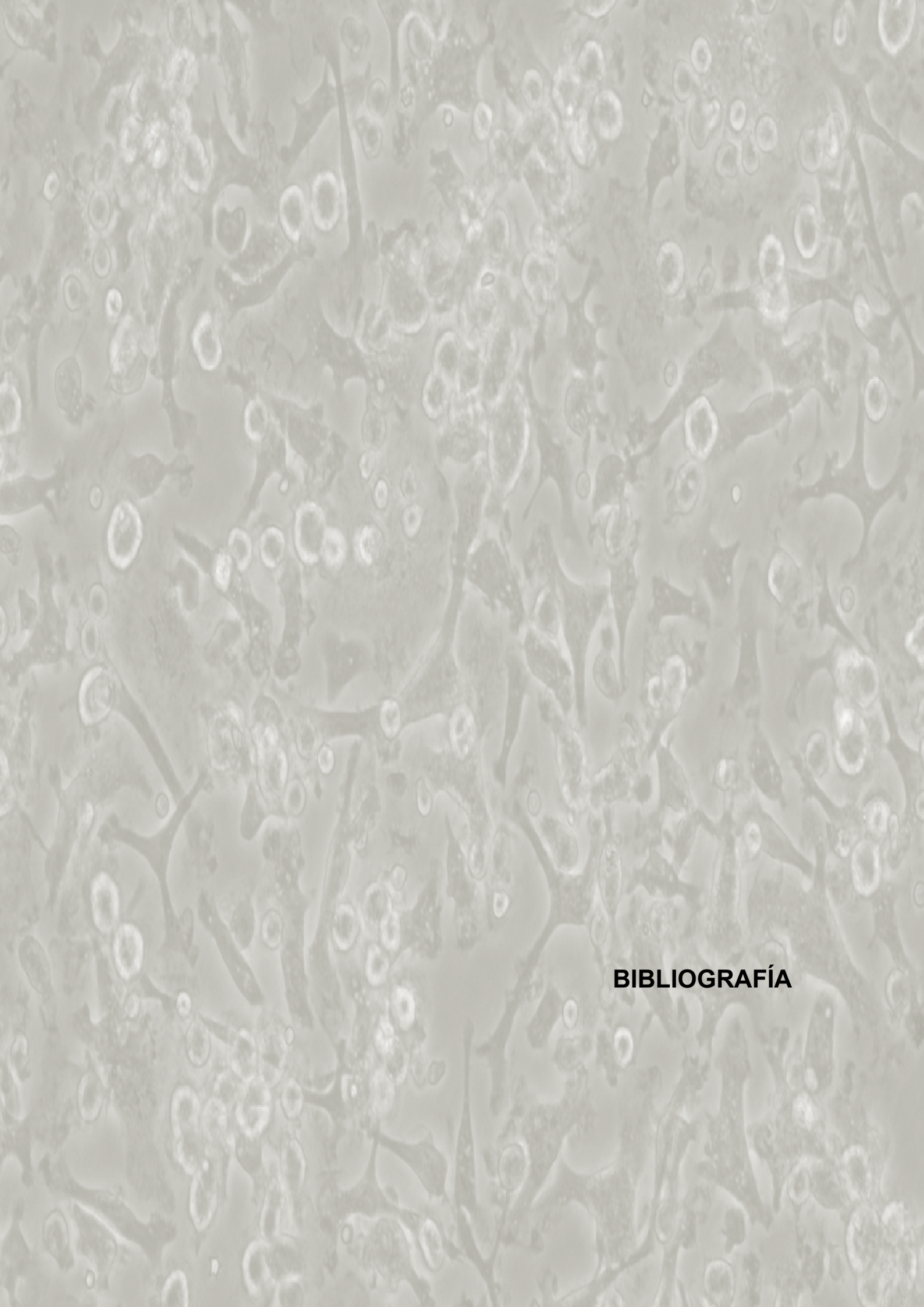
## CONCLUSIONES



Las conclusiones más relevantes de esta Tesis Doctoral han sido:

1. Cot/tpl-2 induce un estado de fosforilación de las MAPKs p38 $\alpha$  y JNK1/2 menos sostenido en el tiempo y estimula la re-síntesis de I $\kappa$ B $\alpha$  en respuesta a la estimulación por LPS.
2. La actividad quinasa de Cot/tpl-2, vía Erk1/2, modula la activación de la cascada de señalización de Akt en respuesta a la estimulación de los TLRs, inhibiendo la expresión de NOS2.
3. La capacidad de Cot/tpl-2 de activar Erk1/2 induce la fosforilación de las dianas del complejo mTORC1 activando la traducción Cap-dependiente de los 5' TOP mRNAs y de los mensajeros de los mediadores inflamatorios TNF $\alpha$ , IL-6 y KC tras la estimulación con LPS.
4. Cot/tpl-2 induce la estabilización de los transcritos de los mediadores inflamatorios TNF $\alpha$ , IL-6 y KC en respuesta a LPS.
5. Cot/tpl-2 modula el estado de activación de los macrófagos en respuesta a LPS, mediante la activación de la expresión de los genes TNF $\alpha$ , KC e IL6, y la represión de los genes IFN $\gamma$ , CCL-5, IP-10, NOS2 e IRF1.





## **BIBLIOGRAFÍA**



1. **Akira, S., and K. Takeda.** 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**:499-511.
2. **Anderson, P.** 2008. Post-transcriptional control of cytokine production. *Nat Immunol* **9**:353-359.
3. **Anjum, R., and J. Blenis.** 2008. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:747-758.
4. **Aoki, M., F. Hamada, T. Sugimoto, S. Sumida, T. Akiyama, and K. Toyoshima.** 1993. The human cot proto-oncogene encodes two protein serine/threonine kinases with different transforming activities by alternative initiation of translation. *J Biol Chem* **268**:22723-22732.
5. **Babu, G. R., W. Jin, L. Norman, M. Waterfield, M. Chang, X. Wu, M. Zhang, and S. C. Sun.** 2006. Phosphorylation of NF-kappaB1/p105 by oncoprotein kinase Tpl2: implications for a novel mechanism of Tpl2 regulation. *Biochim Biophys Acta* **1763**:174-181.
6. **Ballester, A., A. Velasco, R. Tobena, and S. Alemany.** 1998. Cot kinase activates tumor necrosis factor-alpha gene expression in a cyclosporin A-resistant manner. *J Biol Chem* **273**:14099-14106.
7. **Banerjee, A., and S. Gerondakis.** 2007. Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system. *Immunol Cell Biol* **85**:420-424.
8. **Banerjee, A., R. Gugasyan, M. McMahon, and S. Gerondakis.** 2006. Diverse Toll-like receptors utilize Tpl2 to activate extracellular signal-regulated kinase (ERK) in hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:3274-3279.
9. **Beinke, S., J. Deka, V. Lang, M. P. Belich, P. A. Walker, S. Howell, S. J. Smerdon, S. J. Gamblin, and S. C. Ley.** 2003. NF-kappaB1 p105 negatively regulates TPL-2 MEK kinase activity. *Mol Cell Biol* **23**:4739-4752.
10. **Beinke, S., M. J. Robinson, M. Hugunin, and S. C. Ley.** 2004. Lipopolysaccharide activation of the TPL-2/MEK/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade is regulated by IkappaB kinase-induced proteolysis of NF-kappaB1 p105. *Mol Cell Biol* **24**:9658-9667.
11. **Belich, M. P., A. Salmeron, L. H. Johnston, and S. C. Ley.** 1999. TPL-2 kinase regulates the proteolysis of the NF-kappaB-inhibitory protein NF-kappaB1 p105. *Nature* **397**:363-368.
12. **Bogdan, C.** 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* **2**:907-916.
13. **Bogdan, C., M. Rollinghoff, and A. Diefenbach.** 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* **12**:64-76.
14. **Bogdan, C., M. Rollinghoff, and A. Diefenbach.** 2000. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* **173**:17-26.
15. **Cai, Z. G., S. M. Zhang, Y. Zhang, Y. Y. Zhou, H. B. Wu, and X. P. Xu.** 2012. MicroRNAs are dynamically regulated and play an important role in LPS-induced lung injury. *Can J Physiol Pharmacol* **90**:37-43.
16. **Caivano, M., C. Rodriguez, P. Cohen, and S. Alemany.** 2003. 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 regulates endogenous Cot MAPK kinase kinase 1 activity induced by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **278**:52124-52130.
17. **Ceci, J. D., C. P. Patriotis, C. Tsatsanis, A. M. Makris, R. Kovatch, D. A. Swing, N. A. Jenkins, P. N. Tsichlis, and N. G. Copeland.** 1997. Tpl-2 is an oncogenic kinase that is activated by carboxy-terminal truncation. *Genes Dev* **11**:688-700.
18. **Cohen, P.** 2009. Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Cell Biol* **21**:317-324.
19. **Cusack, K., H. Allen, A. Bischoff, A. Clabbers, R. Dixon, S. Fix-Stenzel, M. Friedman, Y. Gaumont, D. George, T. Gordon, P. Grongsaard, B. Janssen, Y. Jia, M. Moskey, C. Quinn, A. Salmeron, C. Thomas, G. Wallace, N. Wishart, and Z. Yu.** 2009. Identification of a selective thieno[2,3-c]pyridine



- inhibitor of COT kinase and TNF- $\alpha$  production. *Bioorg Med Chem Lett* **19**:1722-1725.
20. **Chawla, A.** 2010. Control of macrophage activation and function by PPARs. *Circ Res* **106**:1559-1569.
  21. **Chiariello, M., M. J. Marinissen, and J. S. Gutkind.** 2000. Multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways connect the cot oncoprotein to the c-jun promoter and to cellular transformation. *Mol Cell Biol* **20**:1747-1758.
  22. **Cho, J., M. Melnick, G. P. Solidakis, and P. N. Tsichlis.** 2005. Tpl2 (tumor progression locus 2) phosphorylation at Thr290 is induced by lipopolysaccharide via an Ikappa-B Kinase-beta-dependent pathway and is required for Tpl2 activation by external signals. *J Biol Chem* **280**:20442-20448.
  23. **Cho, J., and P. N. Tsichlis.** 2005. Phosphorylation at Thr-290 regulates Tpl2 binding to NF-kappaB1/p105 and Tpl2 activation and degradation by lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:2350-2355.
  24. **Dalpke, A., K. Heeg, H. Bartz, and A. Baetz.** 2008. Regulation of innate immunity by suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins. *Immunobiology* **213**:225-235.
  25. **Das, S., J. Cho, I. Lambertz, M. A. Kelliher, A. G. Eliopoulos, K. Du, and P. N. Tsichlis.** 2005. Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF-kappaB in a cell-type and stimulus-specific manner. *J Biol Chem* **280**:23748-23757.
  26. **del Prete, M. J., R. Vernal, H. Dolznig, E. W. Mullner, and J. A. Garcia-Sanz.** 2007. Isolation of polysome-bound mRNA from solid tissues amenable for RT-PCR and profiling experiments. *RNA* **13**:414-421.
  27. **Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart, and Z. J. Chen.** 2000. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**:351-361.
  28. **Diaz-Guerra, M. J., A. Castrillo, P. Martin-Sanz, and L. Bosca.** 1999. Negative regulation by phosphatidylinositol 3-kinase of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *J Immunol* **162**:6184-6190.
  29. **Diefenbach, A., H. Schindler, N. Donhauser, E. Lorenz, T. Laskay, J. MacMicking, M. Rollinghoff, I. Gresser, and C. Bogdan.** 1998. Type 1 interferon (IFN $\alpha$ /beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity* **8**:77-87.
  30. **Dumitru, C. D., J. D. Ceci, C. Tsatsanis, D. Kontoyiannis, K. Stamatakis, J. H. Lin, C. Patriotis, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, G. Kollias, and P. N. Tsichlis.** 2000. TNF- $\alpha$  induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* **103**:1071-1083.
  31. **Eliopoulos, A. G., C. D. Dumitru, C. C. Wang, J. Cho, and P. N. Tsichlis.** 2002. Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *Embo J* **21**:4831-4840.
  32. **Eliopoulos, A. G., C. C. Wang, C. D. Dumitru, and P. N. Tsichlis.** 2003. Tpl2 transduces CD40 and TNF signals that activate ERK and regulates IgE induction by CD40. *Embo J* **22**:3855-3864.
  33. **Erny, K. M., J. Peli, J. F. Lambert, V. Muller, and H. Diggelmann.** 1996. Involvement of the Tpl-2/cot oncogene in MMTV tumorigenesis. *Oncogene* **13**:2015-2020.
  34. **Fairweather, D., and D. Cihakova.** 2009. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J Autoimmun* **33**:222-230.
  35. **Fan, H., and J. A. Cook.** 2004. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res* **10**:71-84.
  36. **Fukao, T., and S. Koyasu.** 2003. PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol* **24**:358-363.
  37. **Gaestel, M., A. Kotlyarov, and M. Kracht.** 2009. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat Rev Drug Discov* **8**:480-499.



38. **Gaestel, M., A. Mengel, U. Bothe, and K. Asadullah.** 2007. Protein kinases as small molecule inhibitor targets in inflammation. *Curr Med Chem* **14**:2214-2234.
39. **Gandara, M. L., P. Lopez, R. Hernando, J. G. Castano, and S. Alemany.** 2003. The COOH-terminal domain of wild-type Cot regulates its stability and kinase specific activity. *Mol Cell Biol* **23**:7377-7390.
40. **Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira, and D. M. Underhill.** 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* **197**:1107-1117.
41. **Garcia-Martinez, J. M., and D. R. Alessi.** 2008. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J* **416**:375-385.
42. **Garcia-Sanz, J. A., W. Mikulits, A. Livingstone, I. Lefkovits, and E. W. Mullner.** 1998. Translational control: a general mechanism for gene regulation during T cell activation. *FASEB J* **12**:299-306.
43. **Gingras, A. C., S. G. Kennedy, M. A. O'Leary, N. Sonenberg, and N. Hay.** 1998. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev* **12**:502-513.
44. **Gordon, S.** 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**:23-35.
45. **Gordon, S., and P. R. Taylor.** 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **5**:953-964.
46. **Grand, F., J. Guitton, and J. Goudable.** 2001. [Optimisation of the measurement of nitrite and nitrate in serum by the Griess reaction]. *Ann Biol Clin (Paris)* **59**:559-565.
47. **Green, N., Y. Hu, K. Janz, H. Q. Li, N. Kaila, S. Guler, J. Thomason, D. Joseph-McCarthy, S. Y. Tam, R. Hotchandani, J. Wu, A. Huang, Q. Wang, L. Leung, J. Pelker, S. Marusic, S. Hsu, J. B. Telliez, J. P. Hall, J. W. Cuozzo, and L. L. Lin.** 2007. Inhibitors of tumor progression loci-2 (Tpl2) kinase and tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) production: selectivity and in vivo antiinflammatory activity of novel 8-substituted-4-anilino-6-aminoquinoline-3-carbonitriles. *J Med Chem* **50**:4728-4745.
48. **Gregorieff, A., S. Pyronnet, N. Sonenberg, and A. Veillette.** 2000. Regulation of SOCS-1 expression by translational repression. *J Biol Chem* **275**:21596-21604.
49. **Guertin, D. A., D. M. Stevens, C. C. Thoreen, A. A. Burds, N. Y. Kalaany, J. Moffat, M. Brown, K. J. Fitzgerald, and D. M. Sabatini.** 2006. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell* **11**:859-871.
50. **Guha, M., and N. Mackman.** 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem* **277**:32124-32132.
51. **Guo, H., N. T. Ingolia, J. S. Weissman, and D. P. Bartel.** 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**:835-840.
52. **Heissmeyer, V., D. Krappmann, F. G. Wulczyn, and C. Scheidereit.** 1999. NF-kappaB p105 is a target of IkappaB kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes. *Embo J* **18**:4766-4778.
53. **Hitti, E., T. Iakovleva, M. Brook, S. Deppenmeier, A. D. Gruber, D. Radzioch, A. R. Clark, P. J. Blackshear, A. Kotlyarov, and M. Gaestel.** 2006. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering

- tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Mol Cell Biol* **26**:2399-2407.
54. **Honda, K., and T. Taniguchi.** 2006. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* **6**:644-658.
55. **Issazadeh-Navikas, S.** 2011. NKT cell self-reactivity: evolutionary master key of immune homeostasis? *J Mol Cell Biol*.
56. **Iwasaki, A., and R. Medzhitov.** 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**:987-995.
57. **Jefferies, H. B., and G. Thomas.** 1994. Elongation factor-1 alpha mRNA is selectively translated following mitogenic stimulation. *J Biol Chem* **269**:4367-4372.
58. **Kaila, N., N. Green, H. Q. Li, Y. Hu, K. Janz, L. K. Gavrín, J. Thomason, S. Tam, D. Powell, J. Cuozzo, J. P. Hall, J. B. Telliez, S. Hsu, C. Nickerson-Nutter, Q. Wang, and L. L. Lin.** 2007. Identification of a novel class of selective Tpl2 kinase inhibitors: 4-Alkylamino-[1,7]naphthyridine-3-carbonitriles. *Bioorg Med Chem* **15**:6425-6442.
59. **Kaiser, F., D. Cook, S. Papoutsopoulou, R. Rajsbaum, X. Wu, H. T. Yang, S. Grant, P. Ricciardi-Castagnoli, P. N. Tsichlis, S. C. Ley, and A. O'Garra.** 2009. TPL-2 negatively regulates interferon-beta production in macrophages and myeloid dendritic cells. *J Exp Med* **206**:1863-1871.
60. **Kamijo, R., H. Harada, T. Matsuyama, M. Bosland, J. Gerecitano, D. Shapiro, J. Le, S. I. Koh, T. Kimura, S. J. Green, and et al.** 1994. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* **263**:1612-1615.
61. **Kawai, T., and S. Akira.** 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ* **13**:816-825.
62. **Kim, T. W., K. Staschke, K. Bulek, J. Yao, K. Peters, K. H. Oh, Y. Vandenburg, H. Xiao, W. Qian, T. Hamilton, B. Min, G. Sen, R. Gilmour, and X. Li.** 2007. A critical role for IRAK4 kinase activity in Toll-like receptor-mediated innate immunity. *J Exp Med* **204**:1025-1036.
63. **Kleinert, H., P. M. Schwarz, and U. Forstermann.** 2003. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* **384**:1343-1364.
64. **Komar, A. A., and M. Hatzoglou.** 2011. Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle* **10**:229-240.
65. **Kontoyiannis, D., G. Boulougouris, M. Manoloukos, M. Armaka, M. Apostolaki, T. Pizarro, A. Kotlyarov, I. Forster, R. Flavell, M. Gaestel, P. Tsichlis, F. Cominelli, and G. Kollias.** 2002. Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor-induced Crohn's-like inflammatory bowel disease. *J Exp Med* **196**:1563-1574.
66. **Kotenko, S. V., C. D. Krause, L. S. Izotova, B. P. Pollack, W. Wu, and S. Pestka.** 1997. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *EMBO J* **16**:5894-5903.
67. **Krcova, Z., J. Ehrmann, V. Krejci, A. Eliopoulos, and Z. Kolar.** 2008. Tpl-2/Cot and COX-2 in breast cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **152**:21-25.
68. **Krishna, M., and H. Narang.** 2008. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci* **65**:3525-3544.
69. **Lang, V., A. Symons, S. J. Watton, J. Janzen, Y. Soneji, S. Beinke, S. Howell, and S. C. Ley.** 2004. ABIN-2 forms a ternary complex with TPL-2 and NF-kappa B1 p105 and is essential for TPL-2 protein stability. *Mol Cell Biol* **24**:5235-5248.
70. **Lee, P. S., A. S. Wilhelmson, A. P. Hubner, S. B. Reynolds, D. A. Gallacchi, T. T. Chiou, and D. J. Kwiatkowski.** 2010. mTORC1-S6K activation by endotoxin contributes to cytokine up-regulation and early lethality in animals. *PLoS One* **5**:e14399.

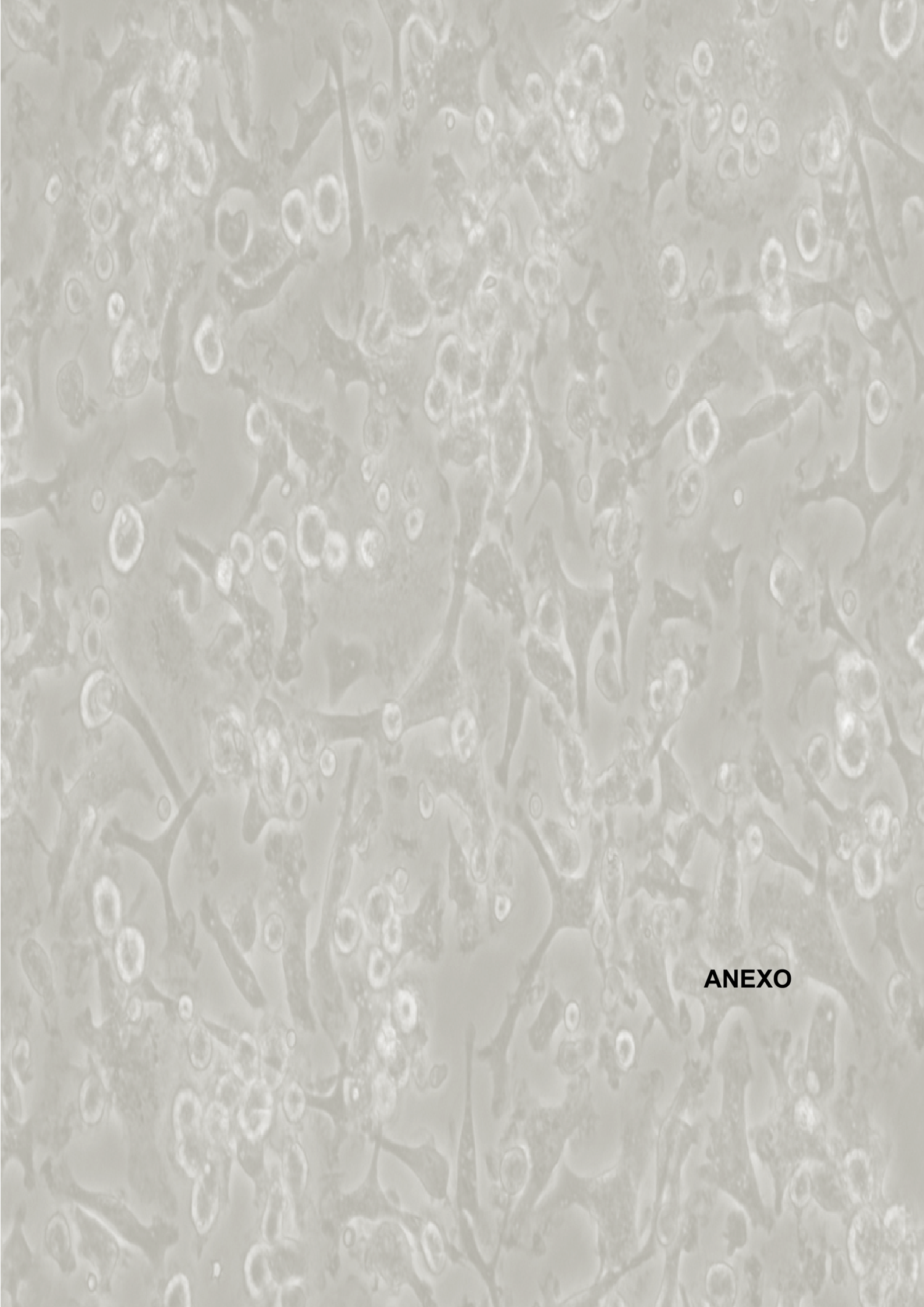
71. **Li, Y. L., C. Torchet, J. Vergne, and M. C. Maurel.** 2007. A cis and trans adenine-dependent hairpin ribozyme against Tpl-2 target. *Biochimie* **89**:1257-1263.
72. **Li, Y. L., J. Vergne, C. Torchet, and M. C. Maurel.** 2009. In vitro selection of adenine-dependent ribozyme against Tpl2/Cot oncogene. *Febs J* **276**:303-314.
73. **Lin, Q., M. Li, D. Fang, J. Fang, and S. B. Su.** 2011. The essential roles of Toll-like receptor signaling pathways in sterile inflammatory diseases. *Int Immunopharmacol* **11**:1422-1432.
74. **Loniewski, K. J., S. Patial, and N. Parameswaran.** 2007. Sensitivity of TLR4- and -7-induced NF kappa B1 p105-TPL2-ERK pathway to TNF-receptor-associated-factor-6 revealed by RNAi in mouse macrophages. *Mol Immunol* **44**:3715-3723.
75. **Lowenstein, C. J., E. W. Alley, P. Raval, A. M. Snowman, S. H. Snyder, S. W. Russell, and W. J. Murphy.** 1993. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:9730-9734.
76. **Lowenstein, C. J., and E. Padalko.** 2004. iNOS (NOS2) at a glance. *J Cell Sci* **117**:2865-2867.
77. **Luciano, B. S., S. Hsu, P. L. Channavajhala, L. L. Lin, and J. W. Cuozzo.** 2004. Phosphorylation of threonine 290 in the activation loop of Tpl2/Cot is necessary but not sufficient for kinase activity. *J Biol Chem.*
78. **Ma, J., T. Chen, J. Mandelin, A. Ceponis, N. E. Miller, M. Hukkanen, G. F. Ma, and Y. T. Konttinen.** 2003. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci* **60**:2334-2346.
79. **Ma, L., Z. Chen, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and P. P. Pandolfi.** 2005. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* **121**:179-193.
80. **Ma, X. M., and J. Blenis.** 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**:307-318.
81. **MacMicking, J., Q. W. Xie, and C. Nathan.** 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* **15**:323-350.
82. **Mauri, C., and P. A. Blair.** 2010. Regulatory B cells in autoimmunity: developments and controversies. *Nat Rev Rheumatol* **6**:636-643.
83. **Mazumder, B., X. Li, and S. Barik.** 2010. Translation control: a multifaceted regulator of inflammatory response. *J Immunol* **184**:3311-3319.
84. **Medzhitov, R., and C. A. Janeway, Jr.** 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**:295-298.
85. **Meyuhas, O., and A. Dreazen.** 2009. Ribosomal protein S6 kinase from TOP mRNAs to cell size. *Prog Mol Biol Transl Sci* **90**:109-153.
86. **Mielke, L. A., K. L. Elkins, L. Wei, R. Starr, P. N. Tschlis, J. J. O'Shea, and W. T. Watford.** 2009. Tumor progression locus 2 (Map3k8) is critical for host defense against *Listeria monocytogenes* and IL-1 beta production. *J Immunol* **183**:7984-7993.
87. **Miyoshi, J., T. Higashi, H. Mukai, T. Ohuchi, and T. Kakunaga.** 1991. Structure and transforming potential of the human cot oncogene encoding a putative protein kinase. *Mol Cell Biol* **11**:4088-4096.
88. **Moon, M. L., L. K. McNeil, and G. G. Freund.** 2011. Macrophages make me sick: how macrophage activation states influence sickness behavior. *Psychoneuroendocrinology* **36**:1431-1440.
89. **Murray, P. J., and T. A. Wynn.** 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* **11**:723-737.
90. **Ninomiya-Tsuji, J., K. Kishimoto, A. Hiyama, J. Inoue, Z. Cao, and K. Matsumoto.** 1999. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* **398**:252-256.

91. **O'Neill, L. A., and A. G. Bowie.** 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **7**:353-364.
92. **Ohara, R., J. Miyoshi, M. Aoki, and K. Toyoshima.** 1993. The murine cot proto-oncogene: genome structure and tissue-specific expression. *Jpn J Cancer Res* **84**:518-525.
93. **Ohmori, Y., and T. A. Hamilton.** 2001. Requirement for STAT1 in LPS-induced gene expression in macrophages. *J Leukoc Biol* **69**:598-604.
94. **Orian, A., H. Gonen, B. Bercovich, I. Fajerman, E. Eytan, A. Israel, F. Mercurio, K. Iwai, A. L. Schwartz, and A. Ciechanover.** 2000. SCF(beta)-TrCP ubiquitin ligase-mediated processing of NF-kappaB p105 requires phosphorylation of its C-terminus by IkappaB kinase. *Embo J* **19**:2580-2591.
95. **Panda, A., A. Arjona, E. Sapey, F. Bai, E. Fikrig, R. R. Montgomery, J. M. Lord, and A. C. Shaw.** 2009. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol* **30**:325-333.
96. **Papoutsopoulou, S., A. Symons, T. Tharmalingham, M. P. Belich, F. Kaiser, D. Kioussis, A. O'Garra, V. Tybulewicz, and S. C. Ley.** 2006. ABIN-2 is required for optimal activation of Erk MAP kinase in innate immune responses. *Nat Immunol* **7**:606-615.
97. **Pasare, C., and R. Medzhitov.** 2004. Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol* **16**:23-26.
98. **Patriotis, C., A. Makris, S. E. Bear, and P. N. Tsichlis.** 1993. Tumor progression locus 2 (Tpl-2) encodes a protein kinase involved in the progression of rodent T-cell lymphomas and in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:2251-2255.
99. **Patriotis, C., A. Makris, J. Chernoff, and P. N. Tsichlis.** 1994. Tpl-2 acts in concert with Ras and Raf-1 to activate mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:9755-9759.
100. **Paust, S., and U. H. von Andrian.** 2011. Natural killer cell memory. *Nat Immunol* **12**:500-508.
101. **Perez, J. R., K. A. Higgins-Sochaski, J. Y. Maltese, and R. Narayanan.** 1996. Antisense rel A in Cancer. *Methods Mol Med* **1**:183-199.
102. **Proud, C. G.** 2009. mTORC1 signalling and mRNA translation. *Biochem Soc Trans* **37**:227-231.
103. **Robinson, M. J., S. Beinke, A. Kouroumalis, P. N. Tsichlis, and S. C. Ley.** 2007. Phosphorylation of TPL-2 on serine 400 is essential for LPS activation of ERK in macrophages. *Mol Cell Biol*.
104. **Rodriguez, C., M. Pozo, E. Nieto, M. Fernandez, and S. Alemany.** 2006. TRAF6 and Src kinase activity regulates Cot activation by IL-1. *Cell Signal* **18**:1376-1385.
105. **Ronkina, N., A. Kotlyarov, O. Dittrich-Breiholz, M. Kracht, E. Hitti, K. Milarski, R. Askew, S. Marusic, L. L. Lin, M. Gaestel, and J. B. Telliez.** 2007. The mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinases MK2 and MK3 cooperate in stimulation of tumor necrosis factor biosynthesis and stabilization of p38 MAPK. *Mol Cell Biol* **27**:170-181.
106. **Rousseau, S., M. Papoutsopoulou, A. Symons, D. Cook, J. M. Lucocq, A. R. Prescott, A. O'Garra, S. C. Ley, and P. Cohen.** 2008. TPL2-mediated activation of ERK1 and ERK2 regulates the processing of pre-TNF alpha in LPS-stimulated macrophages. *J Cell Sci* **121**:149-154.
107. **Roux, P. P., B. A. Ballif, R. Anjum, S. P. Gygi, and J. Blenis.** 2004. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13489-13494.
108. **Roux, P. P., D. Shahbazian, H. Vu, M. K. Holz, M. S. Cohen, J. Taunton, N. Sonenberg, and J. Blenis.** 2007. RAS/ERK signaling promotes site-specific



- ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem* **282**:14056-14064.
109. **Salmeron, A., T. B. Ahmad, G. W. Carlile, D. Pappin, R. P. Narsimhan, and S. C. Ley.** 1996. Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase. *Embo J* **15**:817-826.
  110. **Sallusto, F., and A. Lanzavecchia.** 2009. Heterogeneity of CD4<sup>+</sup> memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol* **39**:2076-2082.
  111. **Sanchez, A. M., and Y. Yang.** 2011. The role of natural regulatory T cells in infection. *Immunol Res* **49**:124-134.
  112. **Seder, R. A., and R. Ahmed.** 2003. Similarities and differences in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> effector and memory T cell generation. *Nat Immunol* **4**:835-842.
  113. **Soria-Castro, I., A. Krzyzanowska, M. L. Pelaez, J. Regadera, G. Ferrer, L. Montoliu, R. Rodriguez-Ramos, M. Fernandez, and S. Alemany.** 2010. Cot/tpl2 (MAP3K8) mediates myeloperoxidase activity and hypernociception following peripheral inflammation. *J Biol Chem* **285**:33805-33815.
  114. **Stafford, M. J., N. A. Morrice, M. W. Pegg, and P. Cohen.** 2006. Interleukin-1 stimulated activation of the COT catalytic subunit through the phosphorylation of Thr290 and Ser62. *FEBS Lett* **580**:4010-4014.
  115. **Stumpo, D. J., W. S. Lai, and P. J. Blackshear.** 2010. Inflammation: cytokines and RNA-based regulation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **1**:60-80.
  116. **Sugimoto, K., M. Ohata, J. Miyoshi, H. Ishizaki, N. Tsuboi, A. Masuda, Y. Yoshikai, M. Takamoto, K. Sugane, S. Matsuo, Y. Shimada, and T. Matsuguchi.** 2004. A serine/threonine kinase, Cot/Tpl2, modulates bacterial DNA-induced IL-12 production and Th cell differentiation. *J Clin Invest* **114**:857-866.
  117. **Takeda, K., and S. Akira.** 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**:1-14.
  118. **Taylor, P. R., and S. Gordon.** 2003. Monocyte heterogeneity and innate immunity. *Immunity* **19**:2-4.
  119. **Tedder, T. F.** 2010. Innate and adaptive receptors interact to balance humoral immunity. *J Immunol* **184**:2231-2232.
  120. **Thomas, K. E., C. L. Galligan, R. D. Newman, E. N. Fish, and S. N. Vogel.** 2006. Contribution of interferon-beta to the murine macrophage response to the toll-like receptor 4 agonist, lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **281**:31119-31130.
  121. **Thomson, A. W., H. R. Turnquist, and G. Raimondi.** 2009. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol* **9**:324-337.
  122. **Topisirovic, I., Y. V. Svitkin, N. Sonenberg, and A. J. Shatkin.** 2011. Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**:277-298.
  123. **Turvey, S. E., and D. H. Broide.** 2010. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* **125**:S24-32.
  124. **Ueda, T., R. Watanabe-Fukunaga, H. Fukuyama, S. Nagata, and R. Fukunaga.** 2004. Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Mol Cell Biol* **24**:6539-6549.
  125. **Vallabhapurapu, S., and M. Karin.** 2009. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* **27**:693-733.
  126. **Van Acker, G. J., G. Perides, E. R. Weiss, S. Das, P. N. Tsichlis, and M. L. Steer.** 2007. Tumor progression locus-2 is a critical regulator of pancreatic and lung inflammation during acute pancreatitis. *J Biol Chem* **282**:22140-22149.
  127. **Van Ginderachter, J. A., K. Movahedi, G. Hassanzadeh Ghassabeh, S. Meerschaut, A. Beschin, G. Raes, and P. De Baetselier.** 2006. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology* **211**:487-501.

128. **Verhelst, K., L. Verstrepen, B. Coornaert, I. Carpentier, and R. Beyaert.** 2009. Cellular expression of A20 and ABIN-3 in response to Toll-like receptor-4 stimulation. *Methods Mol Biol* **517**:205-215.
129. **Vyas, K., S. Chaudhuri, D. W. Leaman, A. A. Komar, A. Musiyenko, S. Barik, and B. Mazumder.** 2009. Genome-wide polysome profiling reveals an inflammation-responsive posttranscriptional operon in gamma interferon-activated monocytes. *Mol Cell Biol* **29**:458-470.
130. **Wan, Y., H. Xiao, J. Affolter, T. W. Kim, K. Bulek, S. Chaudhuri, D. Carlson, T. Hamilton, B. Mazumder, G. R. Stark, J. Thomas, and X. Li.** 2009. Interleukin-1 receptor-associated kinase 2 is critical for lipopolysaccharide-mediated post-transcriptional control. *J Biol Chem* **284**:10367-10375.
131. **Waterfield, M., W. Jin, W. Reiley, M. Zhang, and S. C. Sun.** 2004. IkappaB kinase is an essential component of the Tpl2 signaling pathway. *Mol Cell Biol* **24**:6040-6048.
132. **Waterfield, M. R., M. Zhang, L. P. Norman, and S. C. Sun.** 2003. NF-kappaB1/p105 regulates lipopolysaccharide-stimulated MAP kinase signaling by governing the stability and function of the Tpl2 kinase. *Mol Cell* **11**:685-694.
133. **Weichhart, T., and M. D. Saemann.** 2009. The multiple facets of mTOR in immunity. *Trends Immunol* **30**:218-226.
134. **Weichhart, T., and M. D. Saemann.** 2008. The PI3K/Akt/mTOR pathway in innate immune cells: emerging therapeutic applications. *Ann Rheum Dis* **67 Suppl 3**:iii70-74.
135. **Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira.** 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* **4**:1144-1150.
136. **Yang, H. T., Y. Wang, X. Zhao, E. Demissie, S. Papoutsopoulou, A. Mambole, A. O'Garra, M. F. Tomczak, S. E. Erdman, J. G. Fox, S. C. Ley, and B. H. Horwitz.** 2011. NF-kappaB1 inhibits TLR-induced IFN-beta production in macrophages through TPL-2-dependent ERK activation. *J Immunol* **186**:1989-1996.
137. **Zhou, H., and S. Huang.** 2010. The complexes of mammalian target of rapamycin. *Curr Protein Pept Sci* **11**:409-424.



**ANEXO**





El trabajo realizado durante el desarrollo de la tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones que se adjuntan como anexo:

Publicaciones que forman parte de la tesis doctoral:

**López-Peláez M**, Fumagalli S, Sanz C, Herrero C, Guerra S, Fernández M, and Alemany S. Cot/tpl2-MKK1/2-Erk1/2 controls cap-dependent mRNA translation in TLR-activated macrophages. Mol.Biol.Cell (en revisión).

**López-Peláez M**, Soria-Castro I, Boscá L, Fernández M, Alemany S. Cot/tpl2 activity is required for TLR-induced activation of the Akt p70 S6k pathway in macrophages: Implications for NO synthase 2 expression. Eur J Immunol. 2011 Jun;41(6):1733-41.

Otras publicaciones:

Soria-Castro I, Krzyzanowska A, **Pelaéz ML**, Regadera J, Ferrer G, Montoliu L, Rodríguez-Ramos R, Fernández M, Alemany S. Cot/tpl2 (MAP3K8) mediates myeloperoxidase activity and hypernociception following peripheral inflammation. J Biol Chem. 2010 Oct 29;285(44):33805-15.

Rodríguez C, López P, Pozo M, Duce AM, **López-Pelaéz M**, Fernández M, Alemany S. COX2 expression and Erk1/Erk2 activity mediate Cot-induced cell migration. Cell Signal. 2008 Sep;20(9):1625-31.

# **Cot/tpl2-MKK1/2-Erk1/2 controls cap-dependent mRNA translation in TLR-activated macrophages**

Marta López-Pelaéz<sup>\*</sup>, Stefano Fumagalli<sup>†‡</sup>, Carlos Sanz<sup>\*</sup>, Clara Herrero<sup>\*</sup>, Susana Guerra<sup>§</sup>, Margarita Fernandez<sup>\*</sup>, and Susana Alemany<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas CISC-UAM. <sup>†</sup>Metabolic Diseases Institute, University of Cincinnati, 2180 E. Galbraith Rd., Cincinnati, OH 45237, USA. <sup>§</sup> Department of Preventive Medicine and Public Health, Universidad Autónoma, Madrid.

<sup>‡</sup>Present address: Inserm U845, Université Paris Descartes, Necker Medical School, 156 rue de Vaugirard. 75015 Paris, France.

**Running title:** Cot/tpl2 regulates translation. **Address correspondence to:** Susana Alemany, IIBm.CSIC-UAM Arturo Duperier 4, 28029 Madrid Spain Fax: 34 91 5854401 Phone: 34 91 4975418. [salemany@iib.uam.es](mailto:salemany@iib.uam.es).

## **Abstract**

Cot/tpl2 is the only MAP3K that activates MKK1/2-Erk1/2 in TLR-activated macrophages. Here we show that Cot/tpl2 regulates RSK, S6 ribosomal protein, and 4E-BP phosphorylation following stimulation of bone marrow derived macrophages with LPS, poly I:C, or zymosan. The dissociation of the 4E-BP—eIF4E complex, key event in the cap-dependent mRNA translation initiation, is dramatically reduced in LPS-stimulated Cot/tpl2 KO macrophages *v.s.* LPS-stimulated Wt macrophages. Accordingly, following LPS activation, increased cap-dependent translation is observed in Wt macrophages, but not in Cot/tpl2 KO macrophages. Besides, the increased incorporation of [<sup>35</sup>S]-cysteine/methionine in several proteins in LPS-stimulated Wt macrophages *v.s.* non-stimulated Wt macrophages, cannot be detected in LPS-stimulated Cot/tpl2 KO macrophages. Accordingly with these data, Cot/tpl2 increases the polysomal recruitment of the 5'TOP eEF1 $\alpha$  and eEF2 mRNAs as well as of inflammatory mediators gene-encoding mRNAs, such as TNF $\alpha$ , IL-6, and KC in LPS-stimulated macrophages. Besides, Cot/tpl2 deficiency also reduces total TNF $\alpha$ , IL-6, and KC mRNA expression in LPS-stimulated macrophages, which is concomitant with a decrease in their mRNA half-life values. Macrophages require a rapid fine-control of translation to provide an accurate and not self-damaging response to host infection and our data here show that Cot/tpl2 controls inflammatory mediators gene-encoding mRNA translation in TLR-activated macrophages.

## **Introduction**

Translation control of genes expression is an important regulatory step, in which the amount of proteins to be produced of already transcribed mRNAs is modulated. Translation of mRNAs is subjected to a tight control by the cells, providing a rapid and adequate response

to external cell stimuli; besides, cells have also developed mechanisms to control the stability of the mRNAs (2, 12, 25). A key limiting step of translation is the initiation step, during which the small ribosome subunit is recruited to the 5'UTR of the cap-mRNA and scans towards the start codon [reviewed in references (23, 28, 49)]. In certain transcripts, and under defined

conditions, the cap is bypassed by utilization of an internal ribosome entry site (IRES), which is located in the 5'UTR of transcripts (43). Cap-dependent translation is facilitated by the recognition of the mRNA 5'm<sup>7</sup>GpppN cap structure by eIF4F, which includes the cap-binding subunit, eIF4E. The assembly of the active eIF4F is blocked by the reversible association of eIF4E with the translation repressors 4E-binding proteins (4E-BPs), being the release of 4E-BP the key event in the control of the cap-dependent mRNA translation initiation. Dissociation of the eIF4E—4E-BP complex is achieved by 4E-BP phosphorylation, controlled by the mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) [reviewed in references (23, 43)]. mTORC1 also phosphorylates/activates S6K1 (p70 S6k), which is responsible of the phosphorylation of the ribosomal protein S6. S6K1 also upregulates peptide elongation by phosphorylating and consequently inhibiting elongation factor 2 kinase (eEF2k), which phosphorylates and represses eEF2 (58). PI3K signaling connected via Akt, by direct phosphorylation of TSC2, can block the TSC1/TSC2 complex inhibitory action over mTORC1 activity [reviewed in references (23, 28, 49)]. Indeed, the PI3K intracellular pathway controls mRNA translation (33), including the translation of the 5'TOP mRNAs that contain a 5' terminal oligopyrimidine tract (5' TOP) and encode components of the translation machinery (29, 38, 41, 55). On the other hand, the activity of mTORC1 and of its downstream effectors is also enhanced by the kinase RSK (4, 42). Activation of the RAS-RAF-MKK1/2-Erk1/2 pathway triggers RSK phosphorylation/activation, which subsequently phosphorylates TSC2 (47). RSK also phosphorylates the subunit of mTORC1, Raptor (9), S6 (48) as well as eEF2k (58). Indeed, both RAF and PI3K pathways stimulate mTORC1 signaling (4, 42).

Activation of PI3K occurs by a broad array of different stimuli in a variety of different cells types. In innate immune cells such as

macrophages, PI3K activation, among other intracellular signaling pathways, occurs upon activation of the different Toll like receptors (TLRs) [reviewed in references (11, 17)]. Receptors of this family sense infection and are stimulated by different pathogen-associated molecular patterns. Activation of the different intracellular pathways upon TLRs stimulation, orchestrates the first line of resistance against infection, triggering the production of cytokines and chemokines critical for host defense (31). All TLRs, except TLR3, recruit the adaptor MyD88 that transduces the intracellular signal to activate the kinase TAK1. Consequently, TAK1 activates the p38 $\alpha$  and JNK MAP kinase pathways, as well as the canonical IKKs, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ . TLR3 and TLR4 recruit the TRIF adaptor that specifically activates the non canonical IKKs, but also IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  [reviewed in references (1, 40)]. Activated IKK $\beta$  phosphorylates I $\kappa$ B and p105 NF- $\kappa$ B, targeting I $\kappa$ B to degradation and p105 NF- $\kappa$ B to a partial proteolysis. In resting cells, Cot/tpl2 (MAP3K8) forms a stable and inactive complex with p105 NF- $\kappa$ B and ABIN2 (A20-binding inhibitor of NF- $\kappa$ B2), among other proteins, protecting Cot/tpl2 from degradation. The partial proteolysis of p105 NF- $\kappa$ B to p50 NF- $\kappa$ B releases Cot/tpl2 from the complex [reviewed in references (20, 57)]. Upon TLR stimulation, dissociated Cot/tpl2 and adequately phosphorylated fully activates MKK1/2 and consequently Erk1/2 (7, 8, 13, 16, 53), prior to being rapidly degraded through the proteasome pathway (19, 59). Cot/tpl2 is the only MAP3K that activates the Erk1/2 pathway under these cell stimulation conditions and fulfils a role in innate immunity and inflammatory hypernociception that cannot be substitute by any other protein (10, 20, 52, 57). Cot/tpl2 participates in the production of IL-1 $\beta$  and represses IFN- $\beta$  transcription (30, 34, 39). Besides, Cot/tpl2 has a critical role in the production of TNF $\alpha$  during inflammatory responses; it regulates the processing of the pre-TNF $\alpha$  protein prior its secretion (46), modulates the nuclear export of TNF $\alpha$  mRNA

(16) and also enhances TNF $\alpha$  gene transcription (6).

In the context of innate immunity, and in addition to the controlled transcriptional activation, the control at the level of translation of cytokine and chemokine mRNAs plays an essential role in the required rapid and accurate response against infection without damage of the host cells [reviewed in references (2, 3, 26)].

Here we show a novel function for Cot/tpl2, the control of mRNA cap-dependent translation in TLR-activated macrophages. Cot/tpl2, via Erk1/2, regulates the dissociation of the 4E-BP—eIF4E complex and the mRNA polysomal recruitment of 5'TOP mRNAs. Cot/tpl2 also controls the recruitment onto translating polysomes of mRNAs that encode proteins involved in the innate immune response such as TNF $\alpha$ , IL-6, and KC. Besides, Cot/tpl2 also increases the half life of these mRNAs, affecting their total mRNA expression levels.

## Results

**Cot/tpl2 controls, in an Erk1/2 dependent manner, 4E-BP1 phosphorylation in TLR-stimulated macrophages.** Cot/tpl2 mediates Erk1/2 activation in macrophages upon engagement of LPS to TLR4 [(8, 16), Fig. 1A]. Subsequently, activated Cot/tpl2 is rapidly degraded through the proteasome pathway (19, 59). Besides, in LPS-activated BMDM, Cot/tpl2 controls the phosphorylation of Akt on S473 [(34), Fig. 1A], a residue phosphorylated by mTORC2 (50). The phosphorylation of SGK1 on S422, which is also dependent of mTORC2 activity (22), was also diminished in LPS-stimulated Cot/tpl2 KO BMDM compared to LPS-stimulated Wt BMDM (Fig. 1A). However, the loss of Cot/tpl2 expression did not affect the phosphorylation of T308 in the activation loop of Akt by PDK1. These data indicate that Cot/tpl2 deficiency does not affect the activation of PDK1 by PI3K in LPS-treated macrophages, but suggest deficient mTORC2 activation in LPS-treated Cot/tpl2 KO BMDM v.s. their Wt counterparts. Akt requires to be phosphorylated on both residues S473 and

T308 to be fully active and to phosphorylate FOXO1 on T24, however phosphorylation of Akt on T308 is sufficient to phosphorylate TSC2 on S939 (24). Accordingly, T24 FOXO1 phosphorylation was clearly reduced in Cot/tpl2 KO BMDM v.s. Wt BMDM upon LPS stimulation, whereas S939 TSC2 phosphorylation was only slightly reduced, just a 20 % following 90 min LPS stimulation (Fig. 1 A).

Compared to their Wt counterparts, LPS-stimulated Cot/tpl2 KO BMDM showed a statistically significant reduction of T573 RSK phosphorylation (Fig. 1B), explaining the reduced phosphorylation in the same setting of its substrate TSC2 in residue S1789 and of the downstream effectors S6K1, S6, and eEF2k (Fig. 1B). The phosphorylation of 4E-BP by mTORC1 is the key signal that triggers the dissociation of eIF4E from the inactive 4E-BP—eIF4E complex, allowing eIF4E to form the active eIF4F complex. Active eIF4F facilitates the initiation of translation by its binding to the m<sup>7</sup>GpppN cap site located at the 5' terminus of all mRNAs (23, 43). Decreased phosphorylation of 4E-BP1 in Cot/tpl2 KO BMDM v.s. their Wt counterparts was already observed in basal conditions and upon LPS stimulation, the difference in the 4E-BP1 phosphorylation ratio was further increased by Cot/tpl2 deficiency (Fig 1C). Of note, total 4E-BP1 expression levels were very similar in both Wt and Cot/tpl2 KO BMDM. On the other hand, the phosphorylation of eIF4E on S209 by MNK, a p38 $\alpha$  and Erk1/2 dependent kinase (36) was also diminished by Cot/tpl2 deficiency in LPS-stimulated BMDM.

To analyze if the observed impaired phosphorylation of proteins involved in the initiation of the cap-dependent mRNA translation by Cot/tpl2 deficiency was just due to the lack of Cot/tpl2 activity or to the knock-down of Cot/tpl2 protein expression, we used Cot/tpl2 KD BMDM that express Cot/tpl2 with a point mutation, in which the lysine responsible for ATP binding (Lys 167) is replaced by Arg and thereby does not have

kinase activity. Indeed, the Cot/tpl2 catalytically inactive protein was not degraded following LPS stimulation, indicating that Cot/tpl2 activity is required to trigger its own degradation (Fig. 2A). Since S235/236 S6 and S366 eEF2k phosphorylation, as well as the phosphorylation S65 4E-BP1 and S209 eIF4E was also diminished in LPS-stimulated Cot/tpl2 KD BMDM as compared to their Wt counterparts (Fig. 2A), we conclude that is just the activity of Cot/tpl2 what is essential in the activation of proteins involved in the cap-dependent mRNA translation. Besides, LPS-stimulated Wt BMDM pre-incubated with PD 0325901, a specific MKK1/2 inhibitor (5), also showed impaired phosphorylation of S6, eEF2k, eIF4E, and 4E-BP1 compared to Wt BMDM following LPS stimulation in the absence of the inhibitor (Fig. 2B). Furthermore, pretreatment with UO126, another MKK1/2 inhibitor, or with rapamycin, an inhibitor of mTORC1 activity also reduced the phosphorylation state of 4E-BP1 in LPS-stimulated Wt BMDM (Fig. 2C). All these data indicate that the capacity of Cot/tpl2 to control Erk1/2 phosphorylation in LPS-activated BMDM is essential for the modulation of the phosphorylation/activation state of proteins involved in the mRNA translation process in LPS-activated macrophages.

LPS signals through both TRIF and MyD88 adaptors following TLR4 activation (1, 40). In macrophages with low levels of the receptor dectin-1, zymosan stimulates TLR2/6 and signals through the MyD88 adaptor (21); whereas poly I:C activates TLR3, a receptor that is incapable of recruiting MyD88 and signals through TRIF (40). Results obtained in Wt and Cot/tpl2 KO BMDM stimulated with poly I:C or with zymosan and analyzed by Western-blot indicated that T573 RSK, S366 eEF2k, S209 eIF4E and S65 4E-BP1 phosphorylation was also controlled by Cot/tpl2 under these cell stimulation conditions (Fig. 3A). However, Wt and Cot/tpl2 KO BMDM showed similar levels of S65 4E-BP

phosphorylation following 15 and 30 min stimulation with IL-10 (Fig. S1).

### **Cot/tpl2 regulates cap-dependent translation in LPS-activated macrophages.**

We next decided to evaluate whether the reduced 4E-BP1 phosphorylation observed by Cot/tpl2 deficiency in TLR-activated BMDM correlated with a diminished dissociation of the 4E-BP1—eIF4E complex. To this end, extracts from Wt and Cot/tpl2 KO BMDM non-treated or treated for 1 or 2 h with LPS were incubated with the m<sup>7</sup>GpppN cap affinity resin and the levels pulled-down of eIF4E and 4E-BP1 proteins were subsequently determined by Western-blot analysis (Fig. 4A). In basal conditions, Cot/tpl2 KO BMDM already showed increased levels of 4E-BP1 bound to eIF4E compared to Wt BMDM. Furthermore, the amount of 4E-BP1 bound to eIF4E decreased in a statistically significant manner upon LPS stimulation of Wt BMDM, but the absence of Cot/tpl2 expression severely affected the release of 4E-BP1 from the 4E-BP1—eIF4E complex in LPS-stimulated BMDM (Fig. 4A). These data prompted us to study the cap-dependent and cap-independent translation rates in LPS-stimulated Wt and Cot/tpl2 KO BMDM. To this end, cells were nucleofected with a bicitronic plasmid in which the Renilla Luciferase cDNA can be only translated by cap-dependent scanning mechanism, whereas translation of the Firefly Luciferase does not happen unless internal initiation at the IRES element occurs (Fig. 4B). Similar levels of cap-independent translation were observed in Wt and Cot/tpl2 KO BMDM stimulated or not with LPS. Nevertheless, cap-dependent translation was increased in Wt BMDM compared to Cot/tpl2 KO BMDM in basal conditions and as expected LPS stimulation of Wt BMDM further increased in a statistically significant manner the cap-dependent translation. However, this increase was hardly detected in Cot/tpl2 KO BMDM following LPS stimulation, resulting in a statistically significant increase in the cap-dependent/cap-independent translation ratio in Wt BMDM *v.s.* Cot/tpl2 KO BMDM (Fig. 4B).

Furthermore, labeling studies revealed an increased incorporation of [<sup>35</sup>S]-Cys/Met in at least 4 proteins in 3 h LPS-stimulated Wt BMDM *v.s.* non-stimulated Wt BMDM (Fig. 4C). However, this increase of [<sup>35</sup>S]-Cys/Met incorporation could not be detected in Cot/tpl2 KO BMDM upon LPS stimulation. All these data indicate that Cot/tpl2 controls the mRNA translation initiation machinery.

**Cot/tpl2 controls the translation of the 5'TOP eEF1 $\alpha$  and eEF2 mRNAs.** BMDM from Wt and Cot/tpl2 KO mice were treated or not with LPS for 3 h and sucrose gradient were performed to separate non polysomal mRNAs and non translating free 40S and 60S ribosomal subunits from moderately- and from actively translating mRNA polysomes. The non polysomal fraction (NP) contained the pool of mRNAs that were not associated with components of the translation machinery or cosedimented with ribosome subunits (monosomes); thus, they were not considered to be translated. The mRNAs contained in the fraction with small-sized polysomes of low molecular weight (LMP) were considered to be translated at moderate levels. The third mRNA fraction (HMP) contained mRNAs that were associated with polysomes of high molecular weight, and they were thus considered to be actively translated (Fig. S2). Upon 3 h LPS stimulation of Wt and Cot/tpl2 KO BMDM, there was an increase in the recruitment of the 5'TOP eEF1 $\alpha$  mRNA to high molecular weight polysomes in detriment of the levels detected in the inactive pool. However, the increase in the recruitment of eEF1 $\alpha$  mRNA on the actively translating polysomes was, in a statistically significant way, lower in Cot/tpl2 KO BMDM *v.s.* Wt BMDM, as determined by Northern-blot analysis (Fig. 5A) as well as by qRT-PCR analysis (Fig. 5B). Similar reduction in the eEF1 $\alpha$  mRNA polysomal recruitment was observed in LPS-stimulated Wt BMDM in the presence of UO126 compared to Wt BMDM stimulated with LPS in the absence of this inhibitor (Fig. S3).

In order to determine if the effects of Cot/tpl2 were unique for the EF1 $\alpha$  mRNA or could be extended to other 5'TOP mRNAs we also analyzed the recruitment onto polysomes of another 5'TOP mRNA, the eEF2 mRNA. In LPS-activated Wt BMDM this transcript was mainly located in fractions containing both moderately and actively translated mRNA, but under the same conditions Cot/tpl2 deficiency mainly abolished eEF2 mRNA polysomal recruitment upon LPS stimulation (Fig. 5B). By contrast,  $\beta$ -Actin mRNA which is known to be constitutively translated was associated mostly to high molecular weight polysomes fraction in stimulated and non-stimulated cells, and irrespective of their genotype. Of note, similar levels of total eEF1 $\alpha$ , eEF2, or  $\beta$ -Actin mRNA were detected in Wt and Cot/tpl2 KO BMDM stimulated or not with LPS (Fig. S4).

**Cot/tpl2 modulates polysomal recruitment of TNF $\alpha$ , IL-6, and KC mRNA in LPS-activated BMDM.** We have previously shown that in LPS-activated macrophages Cot/tpl2 deficiency enhanced about 20 fold IRF1 mRNA levels but only about 4 fold the expression of the IRF1 protein (34). The polysomal mRNA distribution of this transcription factor, involved in macrophages activation [reviewed in reference (54)], indicated that Cot/tpl2 expression was required to increase the recruitment of IRF1 mRNA to high and low molecular weight polysomes upon LPS stimulation of BMDM (Fig. S5). Furthermore, the recovery of I $\kappa$ B $\alpha$  protein levels following TNF $\alpha$  stimulation of mouse embryonic fibroblasts (14) or upon LPS stimulation of BMDM (34) is diminished in the absence of Cot/tpl2. The similar expression levels of I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA following LPS stimulation of Wt and Cot/tpl2 KO BMDM (Fig. S5) could not explain the previously reported impaired I $\kappa$ B $\alpha$  protein expression; however, Cot/tpl2 deficiency reduced I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA levels in the low molecular weight polysomes fraction upon 3 h LPS stimulation (Fig. S5), arguing that Cot/tpl2 stimulates the translation of I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA. Interestingly, I $\kappa$ B $\beta$  showed similar

protein expression levels in Wt and Cot/tpl2 KO BMDM following LPS stimulation (data not shown) and Cot/tpl2 did not appear to regulate I $\kappa$ B $\beta$  mRNA recruitment to polysomes (Fig. S5).

Cot/tpl2 controls TNF $\alpha$  production in LPS-activated macrophages [(16, 46), Fig. 6A]. Besides, an analysis of the TNF $\alpha$  mRNA distribution within the different polysomal RNA fractions upon LPS stimulation of Wt and Cot/tpl2 KO BMDM, indicated that Cot/tpl2 increased TNF $\alpha$  mRNA polysomal recruitment to the moderately and actively mRNA translated fractions (Fig. 6B). Furthermore, Cot/tpl2 deficiency diminished the levels of other two inflammatory mediators, IL-6 and KC in the incubation media of BMDM upon LPS stimulation (Fig. 6A), and LPS-stimulated Cot/tpl2 KO BMDM showed a severely diminished recruitment of IL-6 and KC mRNAs to low and high molecular weight polysomes compared to their Wt counterparts (Fig. 6B).

**Cot/tpl2 increases TNF $\alpha$ , IL-6, and KC mRNA stability in LPS-activated BMDM.** In addition to the reduced recruitment of TNF $\alpha$ , KC, and IL-6 mRNA to polysomes, Cot/tpl2 deficiency also reduced total mRNA levels of TNF $\alpha$  [(46), Fig. 7A], KC [(34), Fig. 7A] and of IL-6 (Fig. 7A) in 3 h LPS-stimulated BMDM. To determine whether Cot/tpl2 enhances the stability of these messengers, Wt and Cot/tpl2 KO BMDM were first treated with LPS for 3 h to induce their expression and subsequently actinomycin D was added to the cell culture media to block transcription. The decay of TNF $\alpha$ , KC, and IL-6 mRNA levels following the addition of actinomycin D was accelerated in Cot/tpl2 KO BMDM compared to Wt BMDM (Fig. 7B). These data indicate that Cot/tpl2 stabilizes TNF $\alpha$ , KC, and IL-6 mRNA, with an increase in the half life of about 2.5 fold for TNF $\alpha$  and IL-6 mRNA and of about 5 fold for the KC transcript. Of note, the half life of  $\beta$ -Actin mRNA was not affected by Cot/tpl2 deficiency. All these data indicate

that Cot/tpl2 also controls mRNA stability of cytokines and chemokine transcripts in the context of the innate immune response generated upon LPS stimulation of macrophages.

## Discussion

Cot/tpl2 has emerged as an attractive target to develop new and improved anti-inflammatory drugs (10, 18), since it fulfils a role following TLR-activation of macrophages that affects the innate immune response [reviewed in reference (20)]. Here, we show a novel function for Cot/tpl2 in controlling the activation state of proteins involved in the cap-dependent translation initiation. The PI3K-Akt-TSC2-mTORC1 pathway plays, through their downstream effectors, a key role in the maintenance of translation (33). However, the fact that in TLR-activated macrophages Cot/tpl2 deficiency does not alter the phosphorylation of Akt on T308, but only on S473 indicates that Cot/tpl2 does not modulate 4E-BP phosphorylation through Akt; since the partial activation of Akt, P-T308 Akt, by PI3K-PDK1 upon TLR stimulation is sufficient to transduce the activatory signal to TSC2 (24). On the other hand, the RAS-RAF-MKK1/2-Erk1/2 pathway, by activating the Erk1/2 dependent kinase RSK, also triggers mTORC1 activation [reviewed in references (4, 42)]. Stimulation of the receptors of the TLR/IL-1R superfamily does not activate any of the RAF proteins and the activation of the MKK1/2-Erk1/2 pathway is entirely mediated by Cot/tpl2 (7, 8, 13, 20, 45). Based on the data showed here, and taking into account the mechanism by which Cot/tpl2 is activated (20, 45, 57), we can conclude that following TLR activation the TAK1-IKK $\beta$ -Cot/tpl2-MKK1/2-Erk1/2 pathway has also as a downstream effector RSK. Besides, Cot/tpl2 dependent activation of RSK links Cot/tpl2, via Erk1/2, with the capacity to control cap-dependent mRNA translation initiation, the key rate limiting step in the translation process. Nevertheless, we cannot rule out the possibility that Cot/tpl2-MKK1/2-Erk1/2 also inhibits the

TSC1-TSC2 complex and consequently increases mTORC1 activity, by Erk1/2 direct phosphorylation of TSC2 on S664 (35). These data indicate a novel role of Cot/tpl2 modulating the now evident important role that mTORC1 substrates have in the innate immunity development [reviewed in references (56, 60)].

4E-BP phosphorylation by mTORC1 is the key event in the regulation of cap-dependent translation. Here we show that Cot/tpl2-MKK1/2-Erk1/2 triggers 4E-BP1 phosphorylation by activating mTORC1, since not only MKK1/2 inhibitors, but also rapamycin, without inhibiting Erk1/2 activation, inhibits 4E-BP1 phosphorylation in LPS-stimulated Wt BMDM. Dissociation of phosphorylated 4E-BP from the eIF4E—4E-BP complex allows the formation of the active eIF4F that facilitates the initiation of translation by its binding to the m<sup>7</sup>GpppN, located in the 5' region of most mRNA sequences (23, 43). Accordingly with the deficient 4E-BP1 phosphorylation in LPS-stimulated Cot/tpl2 KO BMDM *v.s.* Wt BMDM, Cot/tpl2 deficiency also prevents in a statistically significant manner the dissociation of the eIF4E—4E-BP complex, diminishes the cap-dependent Renilla Luciferase translation and abolishes the increased [<sup>35</sup>S]-Cys/Met incorporation into specific proteins upon LPS stimulation of macrophages. All these data indicate that Cot/tpl2 controls the activation of the cap-dependent translational machinery in TLR-activated macrophages. Accordingly, mRNA recruitment to high and/or low molecular weight polysomes of transcripts encoding proteins that are involved in the innate immune response, such as TNF $\alpha$ , IL-6, and KC is severely diminished by Cot/tpl2 deficiency.

This here new described capacity of Cot/tpl2 to control the activation state of proteins involved in the mRNA translation process occurs independently of the type of adaptor, MyD88 or TRIF used by TLRs to transduce the activatory signals, since it is observed upon both poly I:C

or zymosan stimulation of macrophages. Nevertheless, this capacity of Cot/tpl2 is, up to now, a selective and specific event triggered by TLR activation, since Cot/tpl2 has no effect on 4E-BP phosphorylation in BMDM stimulated with IL-10, which utilizes a receptor distinct from the TLR family (32) and does not activates Cot/tpl2 (34). In this context, it has been recently reported that Cot/tpl2 is also the only MAP3K that activates Erk1/2 in signals initiated by the thrombin-activated G protein-coupled receptor protease-activated receptor-1 (27); thus the possibility that Cot/tpl2 could control cap-dependent translation initiation in other biological processes, cannot be excluded.

Here we also describe that Cot/tpl2 regulates the translation of the 5'TOP mRNAs, eEF1 $\alpha$  and eEF2. The 5'TOP mRNAs contain a 5' terminal oligopyrimidine tract (5' TOP) and encode ribosomal proteins involved in the process of mRNA translation (29, 38, 41, 55). Indeed, eEF1 $\alpha$  and eEF2 control both the elongation step. Upon LPS stimulation, Cot/tpl2 decreases the number of eEF1 $\alpha$  and eEF2 mRNAs copies within the high and low weight molecular polysomes mRNA fractions, suggesting that not only the initiation step, but also the elongation step could be affected by Cot/tpl2.

Cot/tpl2 modulates TNF $\alpha$ , KC, and IL-6 mRNA polysomal recruitment in activated macrophages, but also participates in the expression of their total mRNA levels upon LPS stimulation of macrophages. Total mRNA levels are the result of both, the rate of gene transcription and the stability of the mRNA itself. We have previously shown that Cot/tpl2 activity enhances TNF $\alpha$  promoter gene transcription (6), and our data here demonstrate that Cot/tpl2 increases the half life of IL-6, TNF $\alpha$ , and KC mRNA. All the three TNF $\alpha$ , IL-6, and KC mRNAs contain AU-rich elements in the 3'UTR, which are determinant for modulating their half life in the context of inflammation [reviewed in references (2, 37)]. In this context it has been previously reported



that Cot/tpl2 modulates the cytoplasmic TNF $\alpha$  mRNA expression by a mechanism that targets the AU-rich element in the 3'UTR of the TNF $\alpha$  mRNA upon LPS stimulation (16). Further studies required to be done to determine whether Cot/tpl2 regulates any of the different AU-rich sequence-specific RNA-binding proteins or controls the activity of microRNAs responsible for mRNA stability (25) in the context of the TLR immune response.

Translational control offers a strategic advantage, because the use of the pre-existing mRNAs bypasses the lengthy nuclear control mechanisms (e.g., transcription, splicing, and transport). At the same time, it provides the reversibility through modifications of the regulatory intermediates, mainly via reversible phosphorylation and provides macrophages with the required rapid and accurate response capacity. Innate immune system cells are the first line of defense against pathogens infection and the fine-control of the translation levels of the inflammatory mediators by these cells is a crucial requirement for the proper development of the innate immune response. Indeed, the host response against infection is a double-edged sword as an uncontrolled response can exacerbate tissue damage, and the control of inflammatory mediators at the level of translation has emerged as a key step in adjusting the magnitude of the response [reviewed in references (2, 37, 56)]

Cot/tpl2 has emerged as an interesting new anti-inflammatory target by its capacity to activate Erk1/2, without involving the RAFs proteins, during the innate immune response. Here we show that Cot/tpl2 controls mRNA stability and cap-dependent mRNA translation in the context of the innate immune response generated upon the stimulation of macrophages by LPS, modulating at post-transcriptional level the production of inflammatory mediators involved in the host response.

### Experimental Procedures

**Mice, BMDM preparation and stimulation.** C57BL/6J Wild type (Wt), C57BL/6J Cot/tpl2

Knock-Out (KO) animals were produced from heterozygotic mice (Cot/tpl2 KO $\pm$  x Cot/tpl2 KO $\pm$ ) and C57BL/6J Cot/tpl2 Kinase Dead (KD) animals were produced from heterozygotic C57BL/6J Cot/tpl2 KD $\pm$  mice. All animals received care according to methods approved under institutional guidelines for the care and use of laboratory animals in research. Bone marrow derived macrophages (BMDM) were obtained as previously described (34) and cells were then stimulated with: LPS (*Salmonella typhimurium*, Sigma L726), poly I:C (Invivogen), zymosan (Invivogen) or IL-10 (PeproTech). Actinomycin D was purchased from Sigma-Aldrich and UO 126 from Tocris. PD 0325901 and rapamycin was a gift from respectively Prof Sir Philip Cohen (Dundee) and from Dr. Victor Calvo (Madrid).

**Western-blot analysis.** Cell extracts were examined by Western-blot as previously described (44), using primary antibodies raised against the following proteins, from Santa Cruz Biotechnology: Cot/tpl2, Erk2, P-T389 S6K1, RSK and S6K1; from Cell Signaling: P-T202/Y204 Erk1/2, P-S473 Akt, P-T308 Akt, Akt, P-T24 FOXO1, FOXO1, P-S939 TSC2, TSC2,  $\beta$ -Actin, P-T573 RSK, P-S235/236 S6, P-S366 eEF2k, eEF2k, P-S65 4E-BP1, 4E-BP1, P-S209 eIF4E, and eIF4E; and from Pierce Thermo Scientific P-S1789 TSC2. Western blot analysis using P-S422 SGK1 (Santa Cruz, sc-16745R) was performed as described previously (22). The secondary antibodies used were raised against rabbit (Cell Signaling), goat (DAKO) and mouse (Amersham Biosciences).

**7-Methyl-GTP pull-down assays.** BMDM were washed twice in ice-cold phosphate-buffered saline, lysated in lysis/binding buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.2% NP-40, 1 U/ml RNase OUT (Invitrogen), 1 mM PMSF, plus 1 tablet/50 ml of Roche inhibitors) and centrifuged at 1,400 rpm for 15 min at 4°C. One milligram of supernatant protein was added to 50  $\mu$ l of 7-methyl GTP (m<sup>7</sup>GTP) Sepharose (Amersham Biosciences), previously pre-cleared with washing buffer (10 mM Tris-HCl

pH 8, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>). Samples were tumbled at 4°C overnight, and after 5 washes in 1 ml of washing buffer plus 1 mM DTT, were boiled in Laemmli sample buffer, separated on 7-15% SDS-PAGE gels, and Western-blot analysis was performed to determine co-precipitated 4E-BP1 and eIF4E proteins.

**[<sup>35</sup>S] Metabolic labeling.** For [<sup>35</sup>S] metabolic labeling studies, BMDM (5 × 10<sup>6</sup> cells) were treated with control media or LPS (300 ng/ml) for 1.5 h, subsequently cells were incubated for 1.5 h in 1 ml of cysteine/methionine-free Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) in the presence of the same concentration of LPS. The last 30 min prior collecting the cells, they were labeled with 500 µCi/ml [<sup>35</sup>S]-Cys/Met Trans-label (ICN, Irvine, CA). Radioactive proteins (30 µg) were separated by 10% SDS-PAGE and exposed to X-ray film.

**BMDM nucleofection.** BMDM were nucleofected with the bicistronic pcDNA3rLuc-poliRESfLuc plasmid (1 µg/1 × 10<sup>6</sup> cells), generously provided by Dr. Alexey Benyumov, using the Ingenio Electroporation Kit (Mirus) and the Nucleofector System (Amaxa Biosystems) and performed according to the manufacturer's instructions. Four hours after transfection cells were washed with RPMI plus 0.5% FBS and incubated overnight in RPMI, 0.5% FBS and gentamicin (80 µg/ml). Subsequently, cells were stimulated with LPS (300 ng/ml) for 3 h and the Renilla- and Firefly Luciferase activities were measured in the cells extracts, according to the manufacturer's instructions (Promega).

**Isolation of polyribosomal RNA and Northern-blot analysis.** BMDM (5 × 10<sup>6</sup> cells) stimulated or not for 3 h with LPS (300 ng/ml) were washed twice on ice with hypotonic buffer (5 mM Tris-HCl pH 7.5, 1.5 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>), lysed in lysis buffer (hypotonic buffer plus 0.5% Triton X-100, 0.5% Na-deoxycholate, 120 U/ml of RNase inhibitor, and 3 mM DTT) and centrifuged at 6,000 rpm

for 8 min at 4°C. After measurement of protein concentration, heparin (1 mg/ml) was added to the extracts. Extract were loaded on a linear sucrose gradient (0.5 and 1.5 M sucrose in 20 mM Tris-HCl pH 8, 80 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM DTT) and centrifuge in a Beckman SW41 rotor at 36,000 rpm for 2 h at 4°C. Gradients were fractionated, following the RNA absorbance profile at 254 nm, in three fractions: NP, non polysomal components, consisting of non polysomal mRNAs and non translating free 40S and 60S ribosomal subunits; LMP, low molecular weight polysomes; and HMP, high molecular weight polysomes fractions. Once collected, fractions were incubated with proteinase K (5 µg/ml) in proteinase K buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM EDTA, 5% SDS) for 30 min at 37°C. RNA for Northern-blot analysis was isolated using phenol/chloroform and hybridization of Northern-blots with the eEF1α probe, was performed as described previously (51).

**qRT-PCR.** Total RNA was isolated from BMDM (5 × 10<sup>6</sup> cells) stimulated or not for 3 h with LPS (300 ng/ml), using the miRNeasy mini Kit and according to the manufacturer's instructions (Quiagen). Recruited mRNA to polysomes was isolated using phenol/chloroform and further purified as described previously (15). Briefly, RNA was subjected to a precipitation with 2 M LiCl on ice overnight. After centrifugation (12,000g, 15 min at 4°C), pellets were washed twice with 70% ETOH (prestored at -20°C), air-dried, and resuspended in RNase-free water. qRT-PCR was performed as described previously (44). The specific TAQMAN primers (Applied Biosystems) TNFα, IL-6, KC, β-Actin, and 18Sr were used.

**Statistical analysis.** Experiments shown have been performed at least 3 times. The graphs data presented, as the means + SD, were analyzed with the Student's t-test. Values were taken to be statistically significant at p<0.05 (p<0.05 \*, p<0.01 \*\*, p<0.001 \*\*\*).

## Acknowledgments

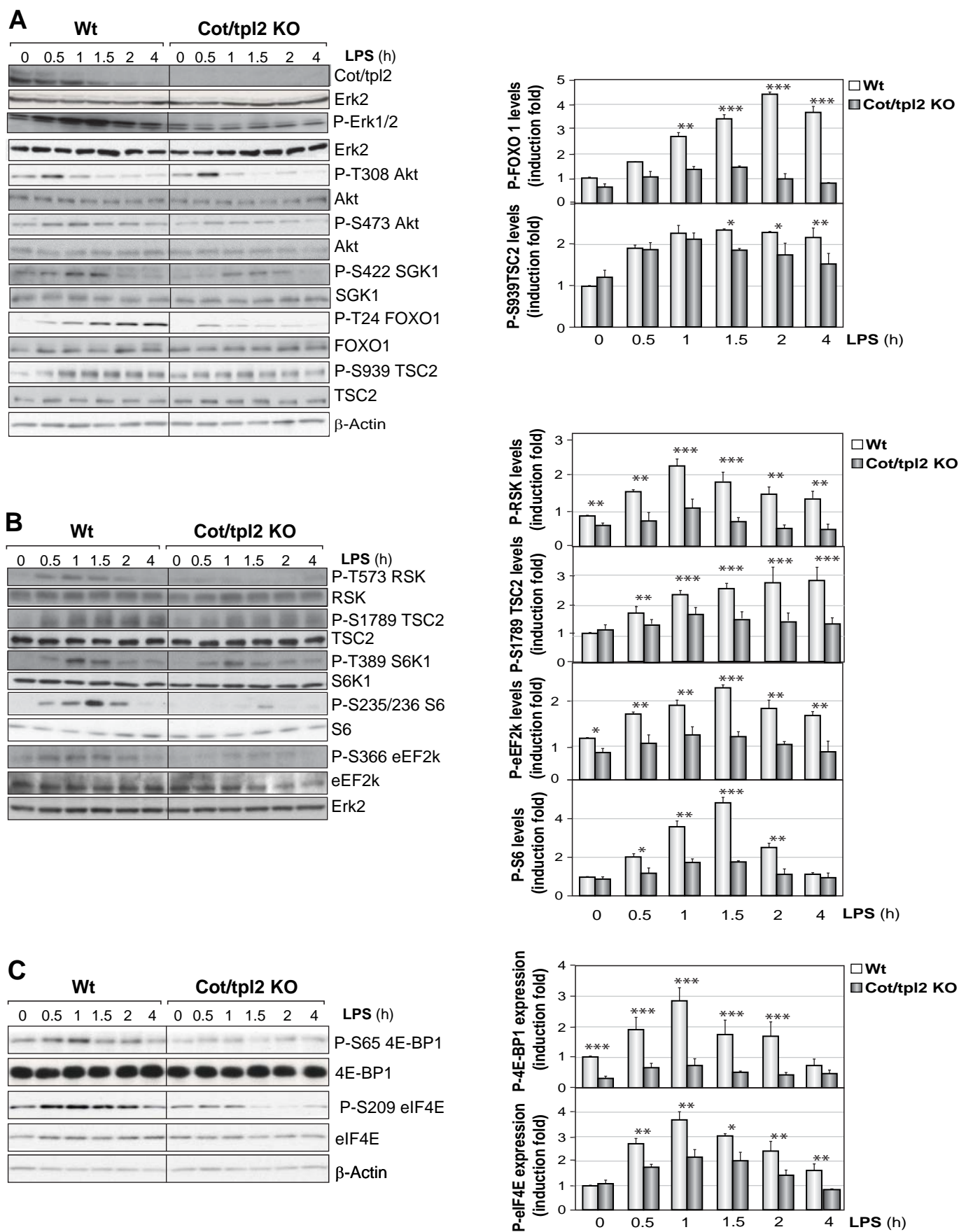
This work was supported by SAF 2011-24481 and Mutua Madrileña grants Madrileña grants to S. Alemany and by FIS 2009-80145 and UAM-CM-CCG10-4911 to S. Guerra. PD 0325901 was a gift from Sir Philip Cohen (Dundee), rapamycin from Dr. Victor Calvo (Madrid) and the bicitronic pcDNA3rLuc-polIRESfLuc plasmid was generously provided by Dr. Alexey Benyumov. We thank Sara Kozma and Amelia Nieto for the critical reading of the manuscript and Raquel Cantalejo for the technical work. MLP is a recipient of FPU-UAM fellowship. SG holds a research contract from the program Ramón y Cajal of Spain. MLP is a recipient of FPU-UAM fellowship.

## References

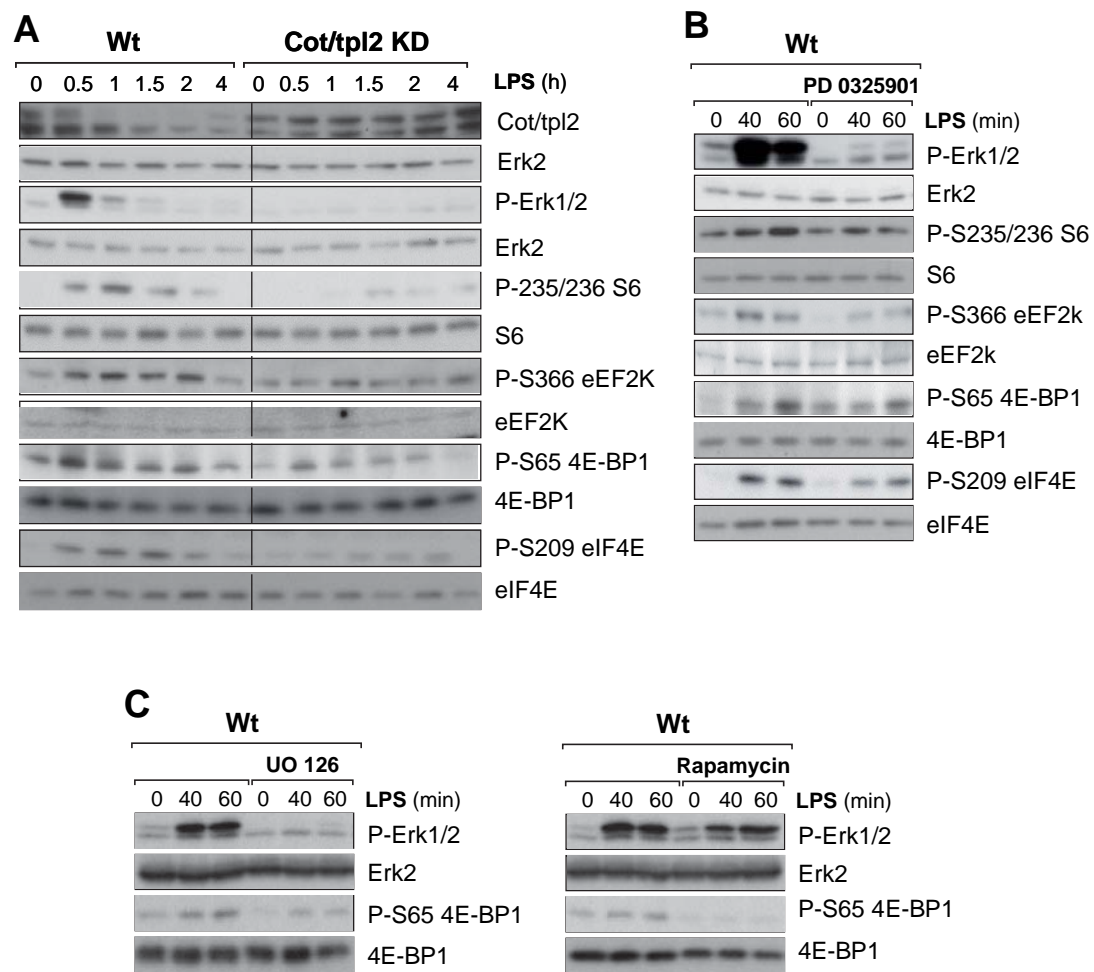
1. **Akira, S., and K. Takeda.** 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**:499-511.
2. **Anderson, P.** 2008. Post-transcriptional control of cytokine production. *Nat Immunol* **9**:353-359.
3. **Anderson, P.** 2010. Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* **10**:24-35.
4. **Anjum, R., and J. Blenis.** 2008. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:747-758.
5. **Bain, J., L. Plater, M. Elliott, N. Shpiro, C. J. Hastie, H. McLauchlan, I. Klevernic, J. S. Arthur, D. R. Alessi, and P. Cohen.** 2007. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* **408**:297-315.
6. **Ballester, A., A. Velasco, R. Tobena, and S. Alemany.** 1998. Cot kinase activates tumor necrosis factor-alpha gene expression in a cyclosporin A-resistant manner. *J Biol Chem* **273**:14099-14106.
7. **Banerjee, A., R. Gugasyan, M. McMahon, and S. Gerondakis.** 2006. Diverse Toll-like receptors utilize Tpl2 to activate extracellular signal-regulated kinase (ERK) in hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:3274-3279.
8. **Caivano, M., C. Rodriguez, P. Cohen, and S. Alemany.** 2003. 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 regulates endogenous Cot MAPK kinase 1 activity induced by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **278**:52124-52130.
9. **Carriere, A., M. Cargnello, L. A. Julien, H. Gao, E. Bonneil, P. Thibault, and P. P. Roux.** 2008. Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. *Curr Biol* **18**:1269-1277.
10. **Cohen, P.** 2009. Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Cell Biol* **21**:317-324.
11. **Chaurasia, B., J. Mauer, L. Koch, J. Goldau, A. S. Kock, and J. C. Bruning.** 2010. Phosphoinositide-dependent kinase 1 provides negative feedback inhibition to Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation in macrophages. *Mol Cell Biol* **30**:4354-4366.
12. **Chen, C. Y., and A. B. Shyu.** 1995. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* **20**:465-470.
13. **Cho, J., and P. N. Tsichlis.** 2005. Phosphorylation at Thr-290 regulates Tpl2 binding to NF-kappaB1/p105 and Tpl2 activation and degradation by lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:2350-2355.
14. **Das, S., J. Cho, I. Lambertz, M. A. Kelliher, A. G. Eliopoulos, K. Du, and P. N. Tsichlis.** 2005. Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF-kappaB in a cell-type and stimulus-specific manner. *J Biol Chem* **280**:23748-23757.
15. **del Prete, M. J., R. Vernal, H. Dolznig, E. W. Mullner, and J. A. Garcia-Sanz.** 2007. Isolation of polysome-bound mRNA from solid tissues amenable for RT-PCR and profiling experiments. *RNA* **13**:414-421.
16. **Dumitru, C. D., J. D. Ceci, C. Tsatsanis, D. Kontoyiannis, K. Stamatakis, J. H. Lin, C. Patriotis, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, G. Kollias, and P. N. Tsichlis.** 2000. TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* **103**:1071-1083.
17. **Fukao, T., and S. Koyasu.** 2003. PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol* **24**:358-363.
18. **Gaestel, M., A. Kotlyarov, and M. Kracht.** 2009. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat Rev Drug Discov* **8**:480-499.

19. **Gandara, M. L., P. Lopez, R. Hernando, J. G. Castano, and S. Alemany.** 2003. The COOH-terminal domain of wild-type Cot regulates its stability and kinase specific activity. *Mol Cell Biol* **23**:7377-7390.
20. **Gantke, T., S. Sriskantharajah, and S. C. Ley.** 2011. Regulation and function of TPL-2, an IkappaB kinase-regulated MAP kinase kinase kinase. *Cell Res* **21**:131-145.
21. **Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira, and D. M. Underhill.** 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* **197**:1107-1117.
22. **Garcia-Martinez, J. M., and D. R. Alessi.** 2008. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J* **416**:375-385.
23. **Gingras, A. C., B. Raught, and N. Sonenberg.** 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* **68**:913-963.
24. **Guertin, D. A., D. M. Stevens, C. C. Thoreen, A. A. Burds, N. Y. Kalaany, J. Moffat, M. Brown, K. J. Fitzgerald, and D. M. Sabatini.** 2006. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell* **11**:859-871.
25. **Guo, H., N. T. Ingolia, J. S. Weissman, and D. P. Bartel.** 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**:835-840.
26. **Hao, S., and D. Baltimore.** 2009. The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Nat Immunol* **10**:281-288.
27. **Hatzia Apostolou, M., G. Koukos, C. Polytarchou, F. Kottakis, O. Serebrennikova, A. Kuliopulos, and P. N. Tsichlis.** 2011. Tumor progression locus 2 mediates signal-induced increases in cytoplasmic calcium and cell migration. *Sci Signal* **4**:ra55.
28. **Hellen, C. U., and P. Sarnow.** 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* **15**:1593-1612.
29. **Jefferies, H. B., S. Fumagalli, P. B. Dennis, C. Reinhard, R. B. Pearson, and G. Thomas.** 1997. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J* **16**:3693-3704.
30. **Kaiser, F., D. Cook, S. Papoutsopoulou, R. Rajsbaum, X. Wu, H. T. Yang, S. Grant, P. Ricciardi-Castagnoli, P. N. Tsichlis, S. C. Ley, and A. O'Garra.** 2009. TPL-2 negatively regulates interferon-beta production in macrophages and myeloid dendritic cells. *J Exp Med* **206**:1863-1871.
31. **Kawai, T., and S. Akira.** 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**:637-650.
32. **Kotenko, S. V., C. D. Krause, L. S. Izotova, B. P. Pollack, W. Wu, and S. Pestka.** 1997. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *EMBO J* **16**:5894-5903.
33. **Laplanche, M., and D. M. Sabatini.** 2009. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* **122**:3589-3594.
34. **Lopez-Pelaez, M., I. Soria-Castro, L. Bosca, M. Fernandez, and S. Alemany.** 2011. Cot/tpl2 activity is required for TLR-induced activation of the Akt p70 S6k pathway in macrophages: Implications for NO synthase 2 expression. *Eur J Immunol* **41**:1733-1741.
35. **Ma, L., Z. Chen, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and P. P. Pandolfi.** 2005. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* **121**:179-193.
36. **Marzec, M., X. Liu, M. Wysocka, A. H. Rook, N. Odum, and M. A. Wasik.** 2011. Simultaneous inhibition of mTOR-containing complex 1 (mTORC1) and MNK induces apoptosis of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) cells. *PLoS One* **6**:e24849.
37. **Mazumder, B., X. Li, and S. Barik.** 2010. Translation control: a multifaceted regulator of inflammatory response. *J Immunol* **184**:3311-3319.
38. **Meyuhas, O.** 2000. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur J Biochem* **267**:6321-6330.
39. **Mielke, L. A., K. L. Elkins, L. Wei, R. Starr, P. N. Tsichlis, J. J. O'Shea, and W. T. Watford.** 2009. Tumor progression locus 2 (Map3k8) is critical for host defense against *Listeria monocytogenes* and IL-1 beta production. *J Immunol* **183**:7984-7993.
40. **O'Neill, L. A., and A. G. Bowie.** 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **7**:353-364.
41. **Patursky-Polischuk, I., M. Stolovich-Rain, M. Hausner-Hanochi, J. Kasir, N. Cybulski, J. Avruch, M. A. Ruegg, M. N. Hall, and O. Meyuhas.** 2009. The TSC-mTOR pathway mediates

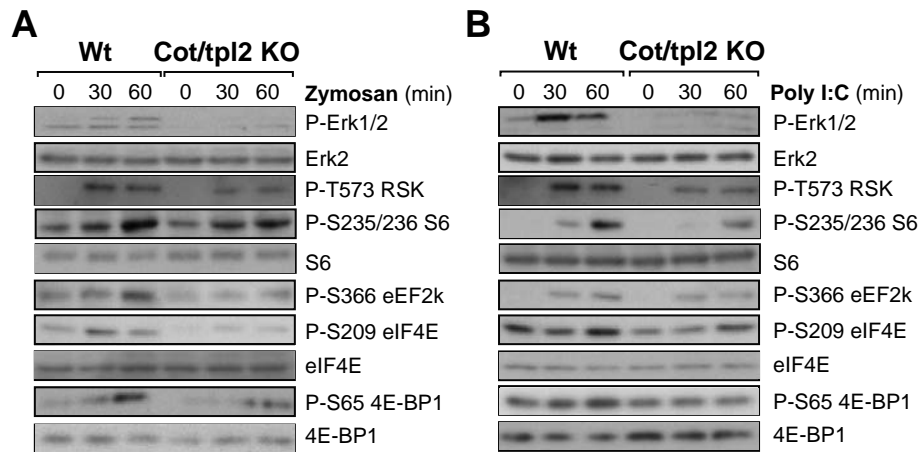
- translational activation of TOP mRNAs by insulin largely in a raptor- or rictor-independent manner. *Mol Cell Biol* **29**:640-649.
42. **Pearce, L. R., D. Komander, and D. R. Alessi.** 2010. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**:9-22.
  43. **Pestova, T. V., V. G. Kolupaeva, I. B. Lomakin, E. V. Pilipenko, I. N. Shatsky, V. I. Agol, and C. U. Hellen.** 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:7029-7036.
  44. **Rodriguez, C., P. Lopez, M. Pozo, A. M. Duce, M. Lopez-Pelaez, M. Fernandez, and S. Alemany.** 2008. COX2 expression and Erk1/Erk2 activity mediate Cot-induced cell migration. *Cell Signal* **20**:1625-1631.
  45. **Rodriguez, C., M. Pozo, E. Nieto, M. Fernandez, and S. Alemany.** 2006. TRAF6 and Src kinase activity regulates Cot activation by IL-1. *Cell Signal* **18**:1376-1385.
  46. **Rousseau, S., M. Papoutsopoulou, A. Symons, D. Cook, J. M. Lucocq, A. R. Prescott, A. O'Garra, S. C. Ley, and P. Cohen.** 2008. TPL2-mediated activation of ERK1 and ERK2 regulates the processing of pre-TNF alpha in LPS-stimulated macrophages. *J Cell Sci* **121**:149-154.
  47. **Roux, P. P., B. A. Ballif, R. Anjum, S. P. Gygi, and J. Blenis.** 2004. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13489-13494.
  48. **Roux, P. P., D. Shahbazian, H. Vu, M. K. Holz, M. S. Cohen, J. Taunton, N. Sonenberg, and J. Blenis.** 2007. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem* **282**:14056-14064.
  49. **Sachs, A. B., and G. Varani.** 2000. Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *Nat Struct Biol* **7**:356-361.
  50. **Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali, and D. M. Sabatini.** 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**:1098-1101.
  51. **Shima, H., M. Pende, Y. Chen, S. Fumagalli, G. Thomas, and S. C. Kozma.** 1998. Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J* **17**:6649-6659.
  52. **Soria-Castro, I., A. Krzyzanowska, M. L. Pelaez, J. Regadera, G. Ferrer, L. Montoliu, R. Rodriguez-Ramos, M. Fernandez, and S. Alemany.** 2010. Cot/tpl2 (MAP3K8) mediates myeloperoxidase activity and hypernociception following peripheral inflammation. *J Biol Chem* **285**:33805-33815.
  53. **Stafford, M. J., N. A. Morrice, M. W. Pegg, and P. Cohen.** 2006. Interleukin-1 stimulated activation of the COT catalytic subunit through the phosphorylation of Thr290 and Ser62. *FEBS Lett* **580**:4010-4014.
  54. **Tamura, T., H. Yanai, D. Savitsky, and T. Taniguchi.** 2008. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol* **26**:535-584.
  55. **Tang, H., E. Hornstein, M. Stolovich, G. Levy, M. Livingstone, D. Templeton, J. Avruch, and O. Meyuhas.** 2001. Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Mol Cell Biol* **21**:8671-8683.
  56. **Thomson, A. W., H. R. Turnquist, and G. Raimondi.** 2009. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol* **9**:324-337.
  57. **Vougioukalaki, M., D. C. Kanellis, K. Gkouskou, and A. G. Eliopoulos.** 2011. Tpl2 kinase signal transduction in inflammation and cancer. *Cancer Lett* **304**:80-89.
  58. **Wang, X., W. Li, M. Williams, N. Terada, D. R. Alessi, and C. G. Proud.** 2001. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J* **20**:4370-4379.
  59. **Waterfield, M. R., M. Zhang, L. P. Norman, and S. C. Sun.** 2003. NF-kappaB1/p105 regulates lipopolysaccharide-stimulated MAP kinase signaling by governing the stability and function of the Tpl2 kinase. *Mol Cell* **11**:685-694.
  60. **Weichhart, T., and M. D. Saemann.** 2009. The multiple facets of mTOR in immunity. *Trends Immunol* **30**:218-226.





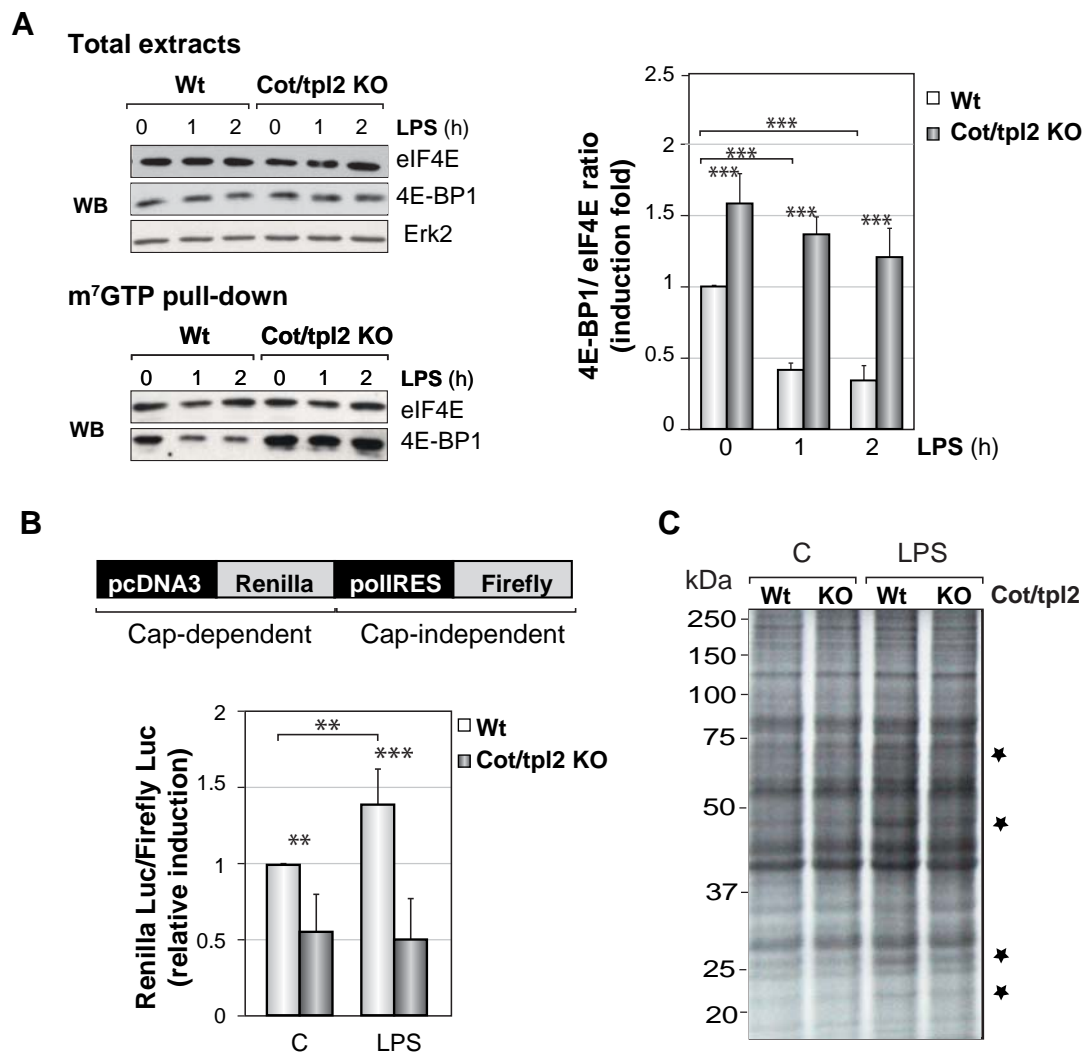


**Figure 2. Erk1/2 dependent phosphorylation of P-S235/236 S6, P-S366 eEF2k, P-S65 4E-BP1, and P-S209 eIF4E in LPS-stimulated BMDM.** **A)** Wt and Cot/tpl2 KD BMDM were stimulated for different lengths of time with LPS (300 ng/ml) and the extracts obtained were analyzed by Western-blots probed with the phospho-antibodies against P-Erk1/2, P-S235/236 S6, P-S366 eEF2k, and P-S65 4E-BP1 and with antibodies against the total protein of Cot/tpl2, Erk2, S6, eEF2k, 4E-BP1, and eIF4E as loading controls. **B)** Wt BMDM were preincubated or not with the MKK1/2 inhibitor PD 0325901 (0.5  $\mu$ M) for 60 min prior to stimulation with LPS (300 ng/ml) for the indicated times, after which the levels of P-Erk1/2, P-S235/236 S6, P-S366 eEF2k, P-S65 4E-BP1, and P-S209 eIF4E were determined by Western-blot analysis. As a loading control, membranes were also blotted with the following antibodies: Erk2, S6, eEF2k, 4E-BP1, and eIF4E. **C)** Wt BMDM were preincubated or not with the MKK1/2 inhibitor UO 126 (10  $\mu$ M) or with rapamycin (10  $\mu$ M) for 60 min prior to stimulation with LPS (300 ng/ml) for the indicated times, after which the levels of P-Erk1/2, P-S65 4E-BP1, Erk2 and 4E-BP1 were determined by Western-blot analysis. **A-C)** One representative experiment of the 3 independently performed is shown.

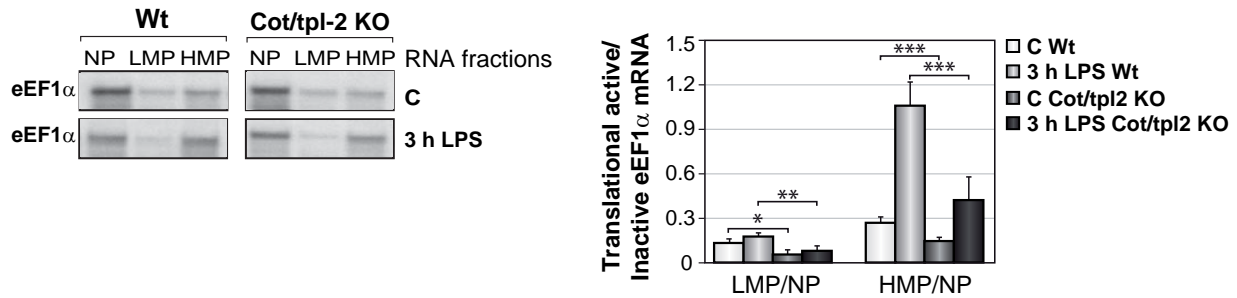
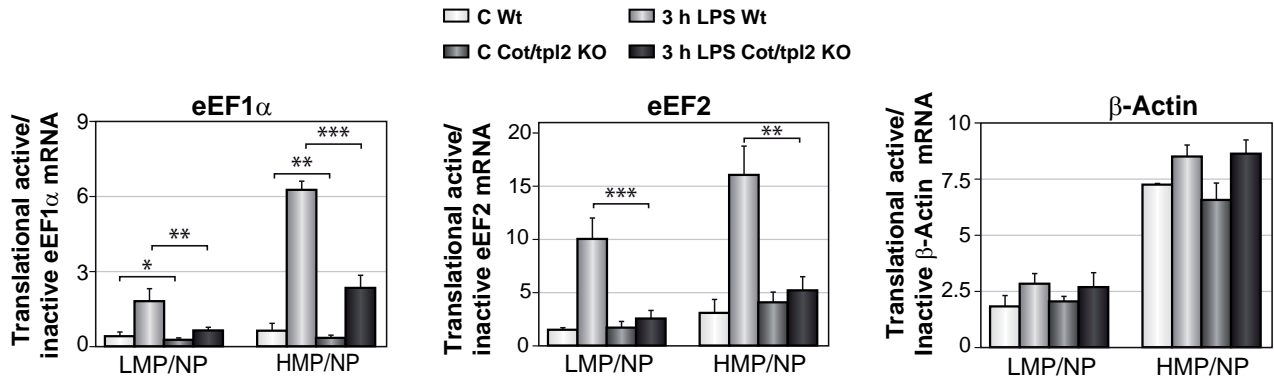


**Figure 3. P-S65 4E-BP1 phosphorylation in Wt and Cot/tpl2 KO BMDM stimulated with zymosan or poly I:C.** Wt and Cot/tpl2 KO BMDM were stimulated with zymosan (10  $\mu$ g/ml) (**A**) or with poly I:C (50  $\mu$ g/ml) (**B**) for 30 and 60 min and the expression levels of P-Erk1/2, P-T573 RSK, P-S235/236 S6, P-S366 eEF2k, P-S209 eIF4E, and P-S65 4E-BP1 were determined in Western-blots. As a loading control the expression levels of Erk2, S6, eIF4E, and 4E-BP were also analyzed. One representative experiment of the 3 independently performed is shown.

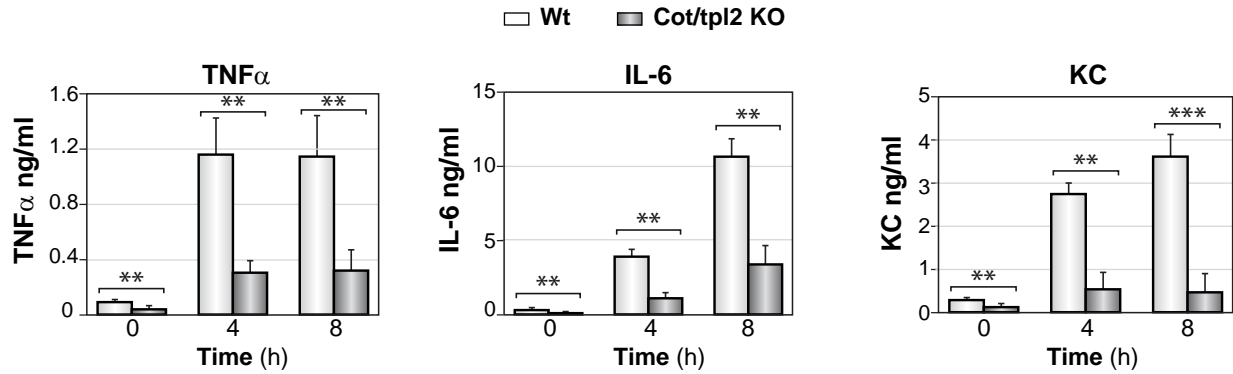
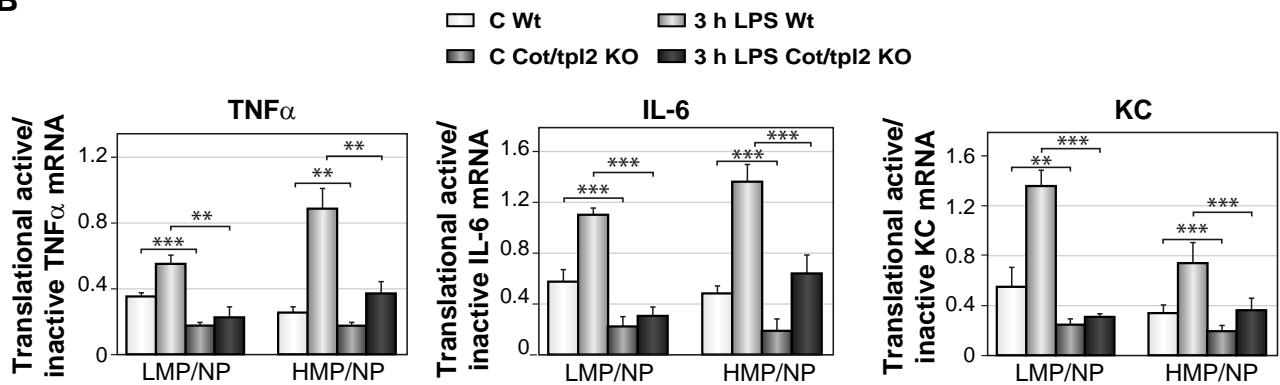




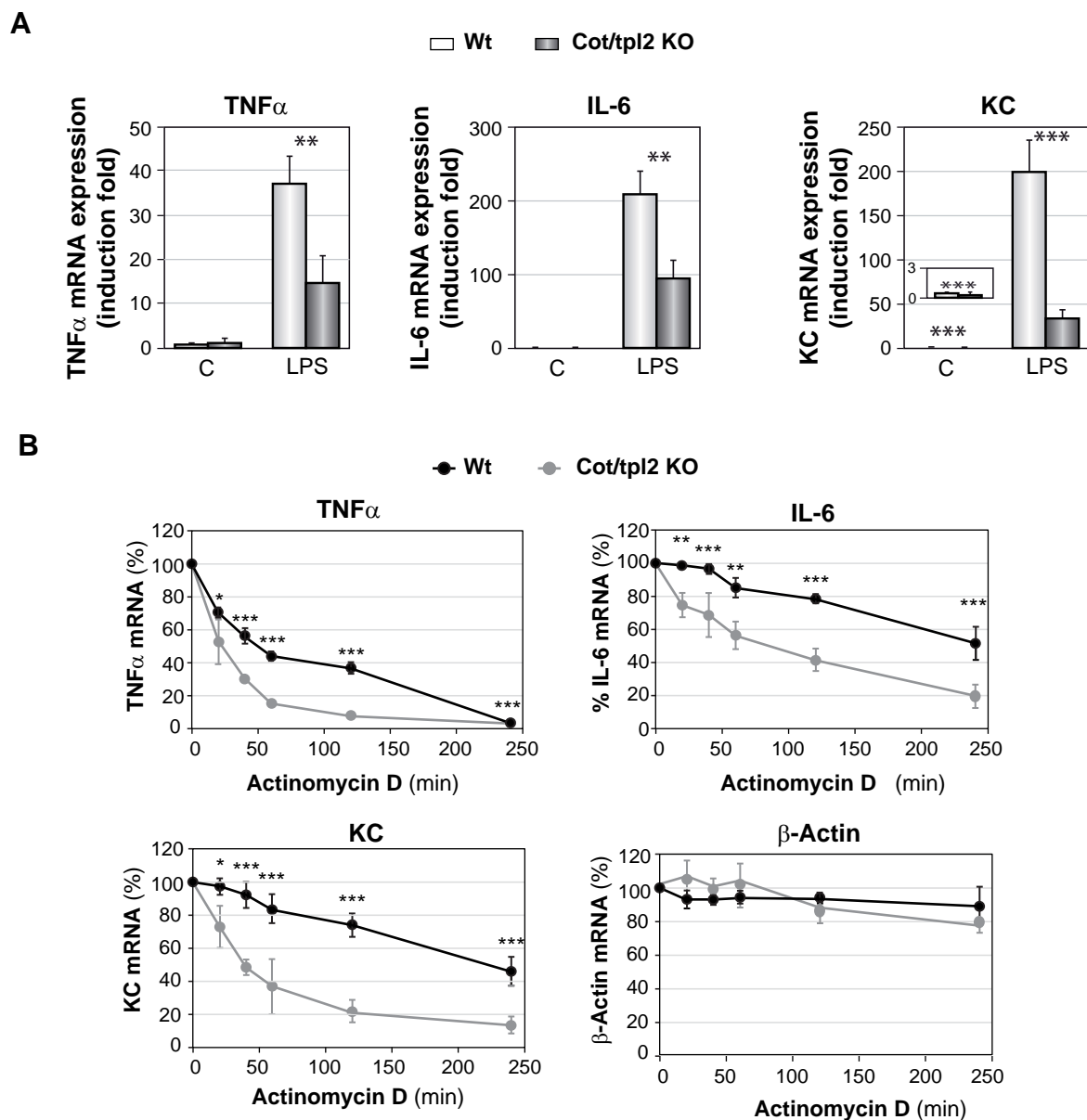
**Figure 4. Cot/tpl2 promotes dissociation of the 4E-BP1—eIF4E complex and cap-dependent translation.** **A)** Cells extracts from Wt and Cot/tpl2 KO BMDM stimulated or not for 1 or 2 h with LPS (300 ng/ml) were subjected to m<sup>7</sup>GTP-Sepharose bead pull-down assays and the amount of 4E-BP1 bound to eIF4E was analyzed by Western-blot. Expression levels of eIF4E, 4E-BP1, and Erk2 in total cells extracts are also shown. Representative experiments of the 3 independently performed are shown. Graph represents the means + SD from 3 independent experiments of the 4E-BP1/eIF4 values, given the value of 1 to the one obtained in Wt BMDM at 0 point time. **B)** Wt and Cot/tpl2 KO BMDM were nucleofected as indicated under Experimental Procedures, with the bicistronic plasmid specified in the Figure. Cells were harvested and Renilla Luc- and Firefly Luc luminescence quantified using a luminometer. Graphs represent the means + SD from 3 independent experiments of Renilla Luc/Firefly Luc values, given respectively the value of 1 to the one obtained in Wt BMDM at 0 point time. **C)** Wt and Cot/tpl2 KO BMDM were stimulated or not for 3 h with LPS (300 ng/ml). Thirty minutes prior cell collection, cells were labeled with [<sup>35</sup>S]-Cys/Met as indicated under Experimental Procedures. Subsequently, cell extracts were obtained. The autoradiograph of the radiolabeled proteins following their separation on a 10% SDS-PAGE is shown. Stars indicate the bands (of about 71, 55, 26, and 23 kDa) with an increased [<sup>35</sup>S] incorporation in Wt BMDM upon LPS stimulation. Similar results were obtained in 3 different independent experiments.

**A****B**

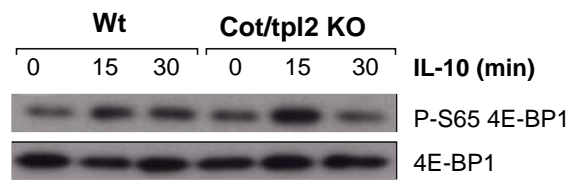
**Figure 5. Cot/tpl2 regulates polysomal recruitment of eEF1α and eEF2 mRNA in LPS-stimulated BMDM.** Cell lysates of Wt and Cot/tpl2 BMDM stimulated for 3 h or not with LPS (300 ng/ml) were subjected to sucrose gradient and 3 mRNA fractions were pooled: non translated mRNA (non polysomal components, consisting of non polysomal mRNAs and non translating free 40S and 60S ribosomal, NP), moderately translated mRNA (low molecular weight polysomes, LMP), and actively translated mRNA (high molecular weight polysomes fraction, HMP). RNA, isolated from the different RNA fractions, was subjected to Northern-blot or qRT-PCR analysis. **A)** Northern-blot showing eEF1α mRNA expression in the NP, LMP, and HMP fractions of non-stimulated and 3 h LPS-stimulated Wt and Cot/tpl2 KO BMDM. On the right, graph represents the means + SD from 5 independent experiments of the quantification of the LMP/NP and HMP/NP eEF1α mRNA ratios in the different cell conditions. **B)** eEF1α, eEF2, and β-Actin mRNA expression in the different polysomes weight RNA fractions analyzed by qRT-PCR. Graphs represent the means + SD from 5 independent experiments of the quantification of the LMP/NP and HMP/NP mRNA ratios in the different cell conditions.

**A****B**

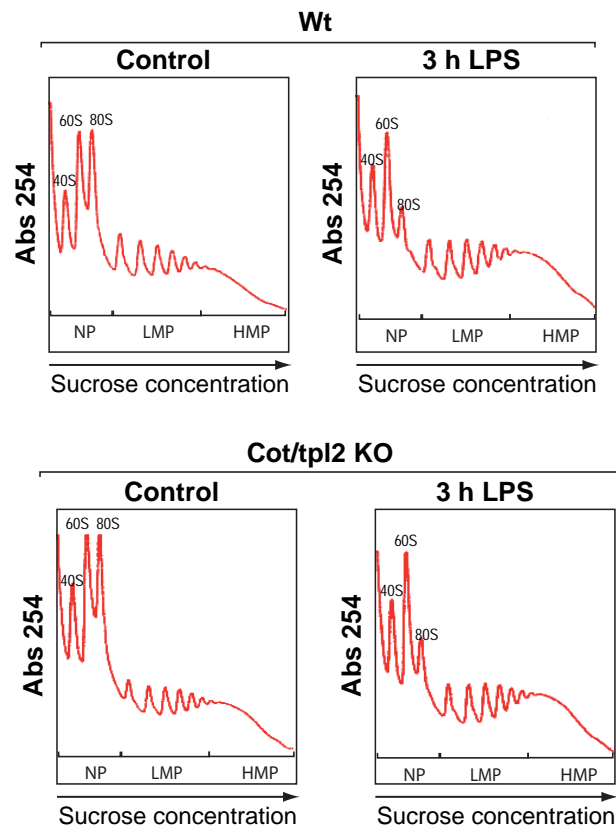
**Figure 6. Cot/tpl2 controls TNF $\alpha$ , KC, and IL-6 production and polysomal recruitment of their mRNAs in LPS-stimulated BMDM.** **A)** The concentration of TNF $\alpha$ , IL-6, and KC in the supernatant of Wt and Cot/tpl2 KO BMDM stimulated or not for 3 or 8 h with LPS (300 ng/ml) was determined using a Luminex 100 system (Upstate), according to the manufacturer's instructions. Graphs show the means + SD from 3 independent experiments. **B)** TNF $\alpha$ , KC, and IL-6 mRNA expression in the different polysomal weight RNA fractions described in Figure 5, were analyzed by qRT-PCR. Graphs represent the means + SD from 5 independent experiments of the quantification of the LMP/NP mRNA and HMP/NP mRNA ratios in the different cell conditions.



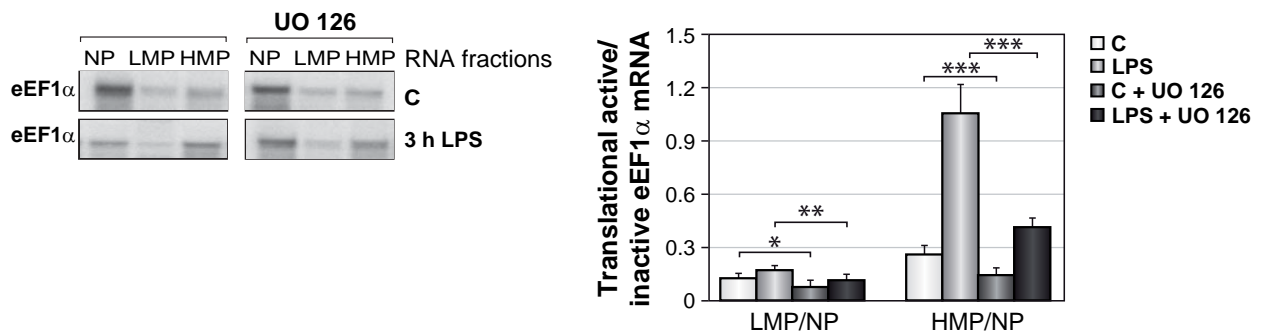
**Figure 7. Cot/tpl2 controls TNF $\alpha$ , KC, and IL-6 mRNA stability in LPS-stimulated BMDM.** **A)** Total RNA from Wt and Cot/tpl2 KO BMDM stimulated or not for 3 h with LPS (300 ng/ml) was extracted and TNF $\alpha$ , KC, and IL-6 mRNA expression was determined by qRT-PCR analysis. TNF $\alpha$ , KC, and IL-6 expression levels were normalized to levels of 18Sr mRNA expression in each assay. Graphs show the mean + SD from 5 independent experiments, given the value of 1 to the one obtained in control Wt BMDM. **B)** The stability of TNF $\alpha$ , KC, IL-6, and  $\beta$ -Actin mRNA in 3 h LPS-stimulated Wt and Cot/tpl2 KO BMDM was determined. Wt and Cot/tpl2 KO BMDM were stimulated for 3 h with LPS (300 ng/ml) and then actinomycin D (5  $\mu$ g/ml) was added. At the indicated times cells were lysed and subsequently the TNF $\alpha$ , IL-6, KC, and  $\beta$ -Actin mRNA levels were analyzed by qRT-PCR and normalized by the expression of 18Sr mRNA. Graphs shown the means + SD from 3 independent experiments, given the value 100% to the normalized mRNA levels obtained for Wt BMDM 3 h after the LPS stimulation.



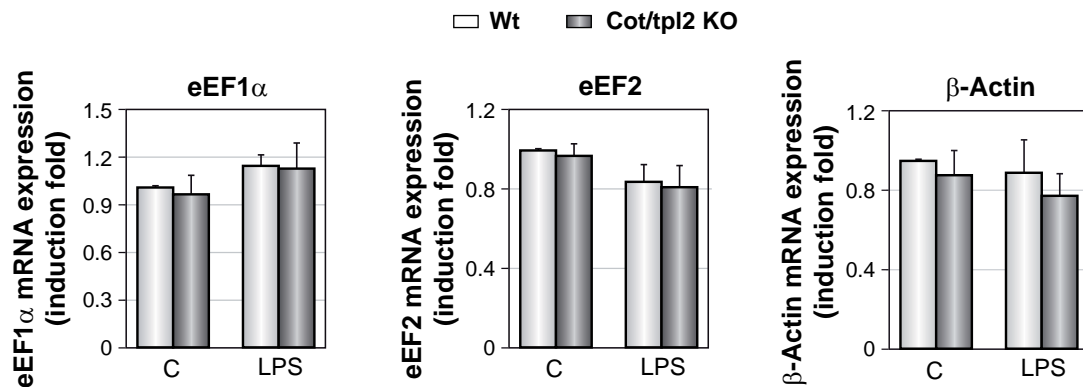
**Figure S1. IL-10-induced P-S65 4E-BP1 phosphorylation in BMDM is independent of Cot/tpl2 expression.** Wt and Cot/tpl2 KO BMDM were stimulated with IL-10 for 30 and 60 min and the expression levels of P-S65 4E-BP1 and 4E-BP were determined in Western-blot. One representative experiment of the 3 performed is shown.



**Figure S2. Representative ribosomal profiling of cell lysates of Wt and Cot/tpl2 KO BMDM.** Cell lysates of Wt and Cot/tpl2 KO BMDM stimulated for 3 h or not with LPS (300 ng/ml) were subjected to sucrose gradient and 3 mRNA fractions were pooled: non translated mRNA (non polysomal components, consisting of non polysomal mRNAs and non translating free 40S and 60S ribosomal, NP), moderately translated mRNA (low molecular weight polysomes, LMP), and actively translated mRNA (high molecular weight polysomes fraction, HMP).

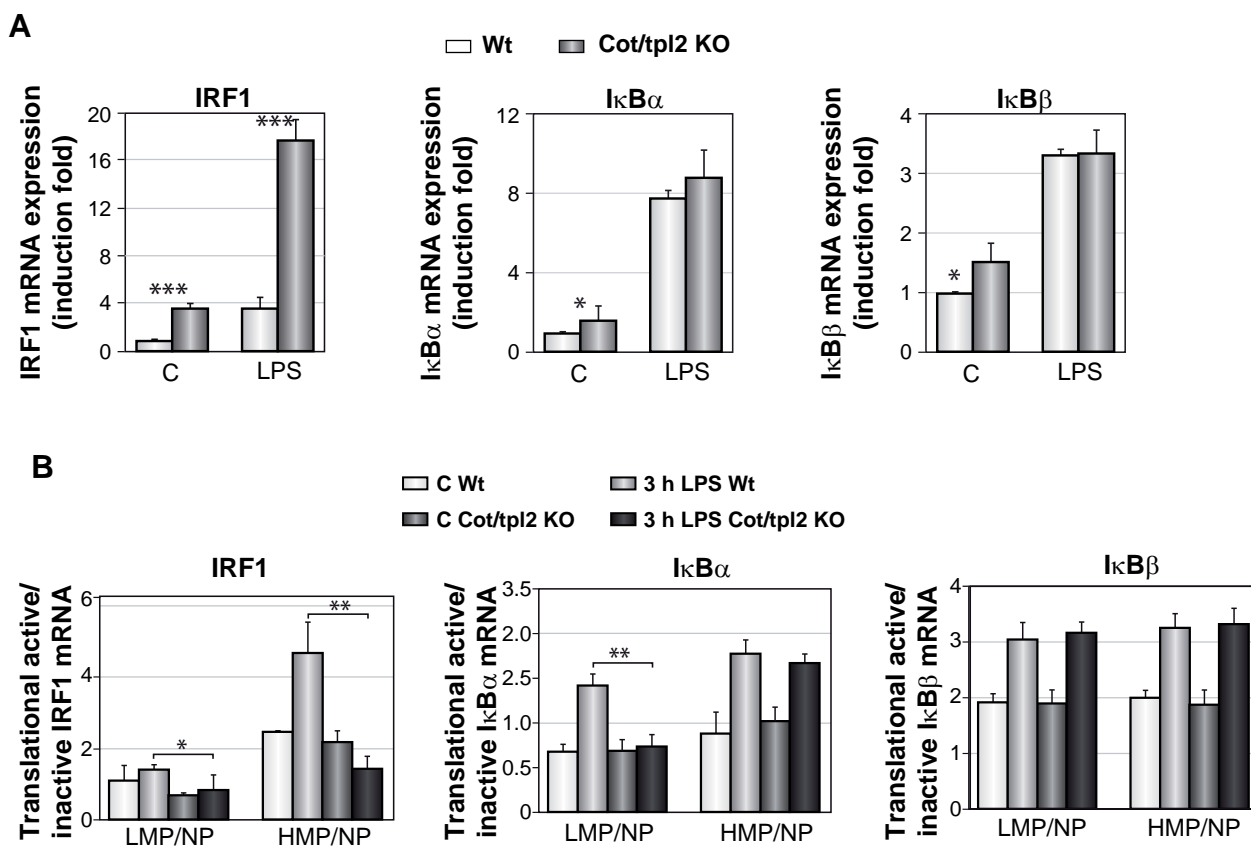


**Figure S3. UO 126 down-regulates eEF1α polysomal recruitment in LPS-stimulated BMDM.** Cell lysates of Wt BMDM preincubated or not for 30 min with the MKK1/2 inhibitor UO 126 (10 μM) and subsequently stimulated for 3 h or not with LPS (300 ng/ml) were subjected to sucrose gradient and 3 mRNA fractions were pooled: non translated mRNA (non polysomal components, consisting of non polysomal mRNAs and non translating free 40S and 60S ribosomal, NP), moderately translated mRNA (low molecular weight polysomes, LMP), and actively translated mRNA (high molecular weight polysomes fraction, HMP). Northern-blot analysis showing eEF1α mRNA expression in the NP, LMP, and HMP fractions of non-stimulated and 3 h LPS-stimulated Wt and Cot/tpl2 KO BMDM was performed. On the left one representative experiment is shown and on the right, graph represents the means + SD from 3 independent experiments of the quantification of the LMP/NP and HMP/NP eEF1α mRNA ratios in the different cell conditions



**Figure S4. eEF1 $\alpha$ , eEF2, and  $\beta$ -Actin mRNA levels in Wt and Cot/tpl2 KO BMDM following LPS stimulation.** Total mRNA levels were determined by qRT-PCR in Wt and Cot/tpl2 KO BMDM stimulated or not for 3 h with LPS (300 ng/ml). eEF1 $\alpha$ , eEF2, and 18Sr mRNAs were determined by Sybr green qRT-PCR using the following primers: eEF1 $\alpha$ , sense 5'- ACACGTAGATTCCGGCAAGT-3' and antisense' 5'-AGGAGCCCTTTCCCATCTC-3; eEF2, sense 5'- GTTGACGTCAGCGGTCTCTT-3' and antisense 5'- GCACGGATCTGATCTACTGTGA-3', and their expression levels were normalized in each assay to levels of 18Sr mRNA, using the primers, sense 5' CCA GTA AGT GCG GGT CAT AAG C and antisense 5' CCT CAC TAA ACC ATC CAA TCG G. The  $\beta$ -Actin primers were from TAQMAN (Applied Biosystems) and were normalized to levels of 18Sr mRNA expression with TAQMAN primers in each assay. Graphs represent the means + SD (n=5), given the value of 1 to the obtained one in non stimulated Wt BMDM.





**Figure S5. Polysomal recruitment of IRF1, IκBα, and IκBβ mRNA in LPS-stimulated Wt and Cot/tpl2 KO BMDM.** **A)** Total IRF1, IκBα, and IκBβ mRNA levels were determined in Wt and Cot/tpl2 KO BMDM stimulated or not for 3 h with LPS (300 ng/ml) by qRT-PCR analysis. Expression levels of the different transcripts were normalized to levels of 18Sr mRNA expression in each assay. Graphs show the mean + SD from 5 independent experiments, given the value of 1 to the one obtained in control Wt BMDM. **B)** IRF1, IκBα, and IκBβ mRNA expression within the different polysomal weight RNA fractions described in Figure 5, was analyzed by qRT-PCR. Graphs represent the means + SD from 5 independent experiments of the quantification of the LMP/NP mRNA and HMP/NP mRNA ratios in the different cell conditions.

# Cot/tpl2 activity is required for TLR-induced activation of the Akt p70 S6k pathway in macrophages: Implications for NO synthase 2 expression

Marta López-Peláez, Irene Soria-Castro, Lisardo Bosca,  
Margarita Fernández and Susana Alemany

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM, Madrid, Spain

LPS stimulation activates IKK and different MAP kinase pathways, as well as the PI3K-Akt-mTOR-p70 S6k pathway, a negative regulator of these MyD88-dependent intracellular signals. Here, we show that Cot/tpl2, a MAP3K responsible for the activation of the MKK1-Erk1/2, controls P-Ser473 Akt and P-Thr389 p70 S6k phosphorylation in LPS-stimulated macrophages. Analysis of the intracellular signalling in Cot/tpl2 KO macrophages versus WT macrophages reveals lower I $\kappa$ B $\alpha$  recovery and higher phosphorylation of JNK and p38 $\alpha$  after 1 h of LPS stimulation. Moreover, Cot/tpl2 deficiency increases LPS-induced NO synthase 2 (NOS2) expression in macrophages. Inhibition of the PI3K pathway abolishes the differences in I $\kappa$ B $\alpha$  and NOS2 expression between Cot/tpl2 KO and WT macrophages following LPS administration. Furthermore, in zymosan- and polyI:C-stimulated macrophages, Cot/tpl2 mediates P-Ser473 Akt phosphorylation, increases I $\kappa$ B $\alpha$  levels and decreases NOS2 expression. In conclusion, these data reveal a novel role for the Cot/tpl2 pathway in mediating TLR activation of the Akt-mTOR-p70 S6k pathway, allowing Cot/tpl2 to fine-control the activation state of other signalling pathways.

**Key words:** Akt · Cot/tpl2 · Macrophage · NO synthase 2 · p70 S6k · TLR



See accompanying Commentary by Martinez



Supporting Information available online

## Introduction

Stimulation of TLRs by the different PAMPs triggers macrophage activation, starting a specific functional program that culminates in the production of inflammatory mediators. With the exception of TLR3, TLRs use MyD88 as a central intracellular adaptor, thereby activating multiple downstream intracellular pathways including IKK. TLR3 and TLR4 recruit the TRIF adaptor, which also activates IKK, but specifically activating TBK1 and the

transcription factor IRF3 (reviewed in [1, 2]). Translocation of IRF3 to the nucleus is necessary, although not sufficient, to induce IFN- $\beta$  expression [3]. Most TLRs also activate the PI3K-Akt-mTOR-p70 S6k pathway, which is considered to be a negative regulator of TLR activation in macrophages and myeloid dendritic cells. Inhibition of this PI3K-Akt-mTOR-p70 S6k pathway in TLR-activated cells augments NO synthase 2 (NOS2) expression [4–8].

Adequate TLR4 stimulation induces the formation of a TLR receptor complex that recruits proteins such as MyD88 and p85 PI3K [9]. PI3K subsequently activates the Akt-mTOR-p70 S6k pathway. Moreover, TLR-bound MyD88 recruits IRAK4 and IRAK1. The phosphorylation of IRAK1 by IRAK4 facilitates TRAF6

Correspondence: Dr. Susana Alemany  
e-mail: salemany@iib.uam.es

recruitment to the receptor complex, and phosphorylated IRAK1 and TRAF6 dissociate from the receptor to form a complex with TAK1. This activated TAK1 can stimulate the p38 and JNK MAP kinase pathways as well as the IKK complex, leading to the degradation of I $\kappa$ B (reviewed in [1, 10]). Activated IKK- $\beta$  phosphorylates p105 NF- $\kappa$ B at multiple residues [11–13], which targets the rapid degradation of p105 NF- $\kappa$ B to p50 NF- $\kappa$ B [11–14]. In resting cells, Cot/tpl-2 forms a stable and inactive complex with p105 NF- $\kappa$ B and ABIN2 (A20-binding inhibitor of NF- $\kappa$ B2), among other proteins, protecting Cot/tpl-2 from degradation. The partial proteolysis of p105 NF- $\kappa$ B to p50 NF- $\kappa$ B releases Cot/tpl-2 from the complex [15–20]. Dissociated and adequately phosphorylated Cot/tpl2 [21–24] fully activates MKK1 and consequently Erk1/2, prior to being rapidly degraded through the proteasome pathway [16, 17, 25–27].

Cot/tpl-2 (MAP3K8) is the sole MAP3K that activates the MKK1-Erk1/2 pathway in response to the activation of receptors of the TLR/IL-1 superfamily, as well as some of the TNF receptor family [17, 28–34]. Thus, Cot/tpl-2 is involved in innate immunity and inflammatory hypernociception [35], its role in mediating pro-inflammatory signals unique from any other protein. Indeed, Cot/tpl-2-deficient macrophages do not secrete TNF- $\alpha$  in response to LPS stimulation [36] and it is also required for the production of PGE<sub>2</sub> in LPS-stimulated macrophages [32].

Here, we demonstrate a novel capacity of Cot/tpl2 to repress TLR-induced activation of NOS2 expression by modulating the activation of the Akt-mTOR-p70 S6k pathway.

## Results

### Knockdown of Cot/tpl-2 enhances LPS-induced NOS2 expression in macrophages

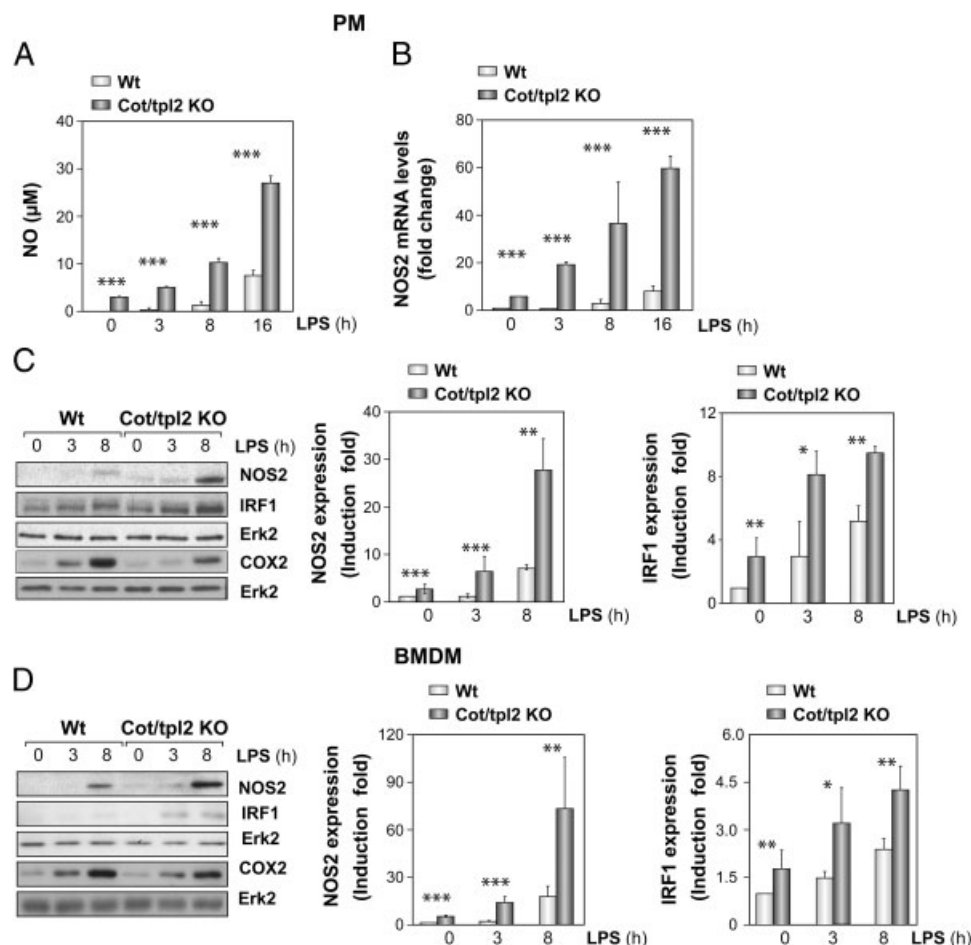
In sepsis, bacterial-derived LPS induces NOS2 expression, contributing to the production of NO in the generation of the host response [37]. Here, we decided to examine the role of Cot/tpl2 on NOS2 expression in macrophages. Flow cytometry analysis of thioglycolate-elicited WT and Cot/tpl2 KO F4/80<sup>+</sup> peritoneal macrophages (PMs) did not reveal differences in their activation state by Cot/tpl2 deficiency (Supporting Information Fig. S1). However, LPS stimulation of Cot/tpl2 KO PMs for varying time periods induced higher NO accumulation, further increased NOS2 protein expression and also enhanced NOS2 mRNA transcripts in comparison with LPS-treated WT PMs (Fig. 1A–C). Stimulation over a range of LPS concentrations (1–10 000 ng/mL) indicated that Cot/tpl2 KO PMs were highly sensitive to NO production; indeed, NOS2 expression was detected in Cot/tpl2 KO PMs, but not in WT PMs, following stimulation with 5 ng/mL of LPS (Supporting Information Fig. S2).

The observed effect of Cot/tpl2 deficiency in PMs was also analyzed in BM-derived macrophages (BMDMs). Both WT and Cot/tpl2 KO BMDMs showed similar expression levels of the

surface antigens tested (Supporting Information Fig. S3); but again, in Cot/tpl2 KO BMDMs higher expression of NOS2 was detected than in WT BMDMs following LPS stimulation (Fig. 1D). As reported previously [32], LPS-stimulated Cot/tpl2 KO BMDMs expressed less COX2 than stimulated WT counterparts. Furthermore, the expression of IRF1, a transcription factor involved in the activation of macrophages (reviewed in [38]), was enhanced by about two fold at the protein level and about 20-fold at the mRNA level in LPS-stimulated Cot/tpl2 KO versus WT BMDMs (Fig. 1D, Supporting Information S4). Cot/tpl2 also controlled in a similar manner IRF1 and COX2 protein expression in LPS-stimulated PMs (Fig. 1D). We next decided to determine how Cot/tpl2 regulates the expression of other genes involved in the macrophage response to LPS stimulation. In agreement with previous data [39, 40], Cot/tpl2 repressed IFN- $\beta$  and IL-12 p40 transcripts levels in LPS-activated macrophages (Supporting Information Fig. S4), furthermore LPS-stimulated Cot/tpl2 KO BMDMs showed enhanced IFN- $\gamma$ , CCL5 and CXCL-10 while decreased CXCL-1 mRNA expression levels versus their LPS-stimulated WT counterparts (Supporting Information Fig. S4).

### Increased p38 $\alpha$ and JNK phosphorylation and impaired I $\kappa$ B $\alpha$ recovery in LPS-stimulated Cot/tpl2 KO macrophages

We next characterized the activation of different intracellular pathways in LPS-stimulated WT and Cot/tpl2 KO BMDMs. In agreement with previous data [17], Cot/tpl2 was rapidly degraded in WT BMDMs following Erk1/2 activation (Fig. 2A). A similar JNK and p38 $\alpha$  phosphorylation state was observed between WT and Cot/tpl2 KO BMDMs within the first 40 min following LPS stimulation, in accordance with earlier studies [17, 36, 39]. However, p38 $\alpha$  and JNK phosphorylation were sustained for longer in LPS-stimulated Cot/tpl2 KO BMDMs versus WT BMDMs. Furthermore, I $\kappa$ B $\alpha$  degradation occurred at an equivalent rate in WT and Cot/tpl2 KO BMDMs, but its recovery was impaired in Cot/tpl2 KO BMDMs. Indeed, at 4 h following LPS stimulation I $\kappa$ B $\alpha$  expression was still low in Cot/tpl2-deficient cells. In this context, it has been previously shown that in mouse embryonic fibroblasts Cot/tpl2 deficiency also impairs I $\kappa$ B $\alpha$  recovery following TNF- $\alpha$  stimulation [34]. The subcellular localization of IRF3 was also monitored in LPS-stimulated WT and Cot/tpl2 KO BMDMs by immunofluorescence staining and the nuclear IRF3 localization following 1 and 2 h LPS stimulation was similar in both WT and Cot/tpl2 KO BMDMs (Supporting Information Fig. S5). Conversely, higher P-Tyr701 Stat1 $\alpha$ / $\beta$  levels were detected in Cot/tpl2 KO versus WT BMDMs 4 h post LPS stimulation (Fig. 2B), in agreement with the reported increase in IFN- $\beta$  levels in LPS-treated Cot/tpl2 KO BMDMs versus WT counterparts ([39], Supporting Information Fig. S4). IFN- $\beta$  as well as IFN- $\gamma$  stimulation of WT and Cot/tpl2 KO BMDMs did not reveal differences in the phosphorylation state P-Tyr701 Stat1 $\alpha$ / $\beta$  following 15 min stimulation (Fig. 2C) and enhanced NOS2 and IRF1 expression was still observed in



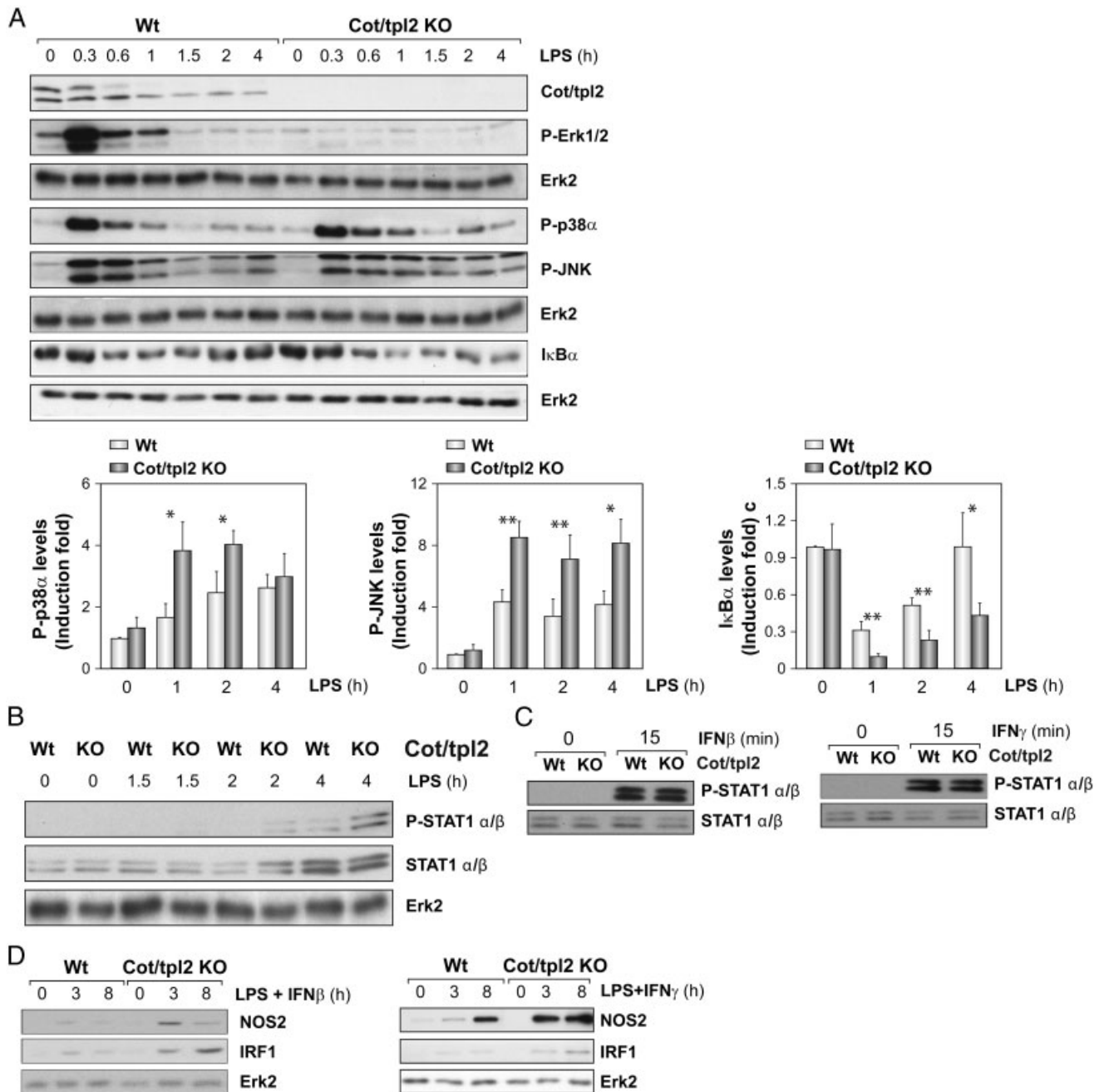
**Figure 1.** Cot/tpl2 represses LPS-induced NOS2 expression. (A) WT and Cot/tpl2 KO PMs were stimulated with LPS (300 ng/mL) for the periods of time indicated. The NO concentration was measured in triplicate in cell supernatants. (B) NOS2 mRNA expression in WT and Cot/tpl2 KO PMs following LPS (100 ng/mL) stimulation for the periods of time indicated. (C) NOS2, IRF1 and COX2 protein expression in cell extracts of cells treated as described in (B) was determined in Western blots. Erk2 protein expression was also determined as loading control. (D) WT and Cot/tpl2 KO BMDMs were stimulated with LPS (300 ng/mL) for varying periods of time and NOS2, COX2, IRF1 and Erk2 expression was determined in Western blots. Erk2 protein expression was also determined as loading control. (A and B) The mean + SD of three independent experiments is shown as fold induction relative to the WT 0 time point. (C and D) The graphs represent the means + SD ( $n = 8$ ) of NOS2 and IRF1 fold induction relative to the WT 0 time point after normalizing the values to total Erk2. One representative experiment of eight is shown. (A–D) Data presented were analysed with Student's *t*-test. Values were taken to be statistically significant at  $p < 0.05$  (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

Cot/tpl2 KO BMDMs compared with WT BMDMs following LPS plus IFN- $\beta$  or LPS plus IFN- $\gamma$  stimulation (Fig. 2D).

### Cot/tpl2 controls TLR4-dependent phosphorylation of Ser473 Akt and Thr389 p70 S6k

The PI3K pathway is a negative regulator of LPS-induced p38 $\alpha$ , JNK and Erk1/2 phosphorylation, impairs I $\kappa$ B $\alpha$  targeting and negatively regulates NOS2 expression [4–6]. Thus, to evaluate whether the increased activation of MyD88-dependent events in LPS-treated Cot/tpl2 KO BMDMs is a consequence of a defect in the activation of this pathway, we measured the accumulation of P-Ser473 Akt in both WT and Cot/tpl2 KO BMDMs. Phosphorylation of Akt was impaired in Cot/tpl2 KO versus WT BMDMs after LPS stimulation (Fig. 3A). Furthermore, Thr389 p70 S6k

phosphorylation was also markedly reduced in LPS-treated Cot/tpl2 KO BMDMs when compared with their LPS-stimulated WT counterparts. Cot/tpl2 also controlled in a similar manner Erk1/2, JNK, Ser473 Akt and Thr389 p70 S6k phosphorylation and I $\kappa$ B $\alpha$  degradation in LPS-stimulated PMs (Fig. 3B). In agreement with previous data [4–6], the presence of wortmannin in LPS-stimulated WT BMDMs completely blocked the phosphorylation of Akt and p70 S6k and further decreased I $\kappa$ B $\alpha$  levels; however, in Cot/tpl2 KO BMDMs the presence of wortmannin did not amplify the LPS-mediated decrease in I $\kappa$ B $\alpha$  expression (Fig. 3C). Furthermore, NOS2 levels were very similar in WT and Cot/tpl2 KO BMDMs after LPS administration in the presence of wortmannin. While the presence of wortmannin in LPS-stimulated WT BMDMs further increased NOS2 expression ([4], Fig. 3D), there was a decrease in NOS2 expression in Cot/tpl2 KO BMDMs stimulated with LPS together with wortmannin. This

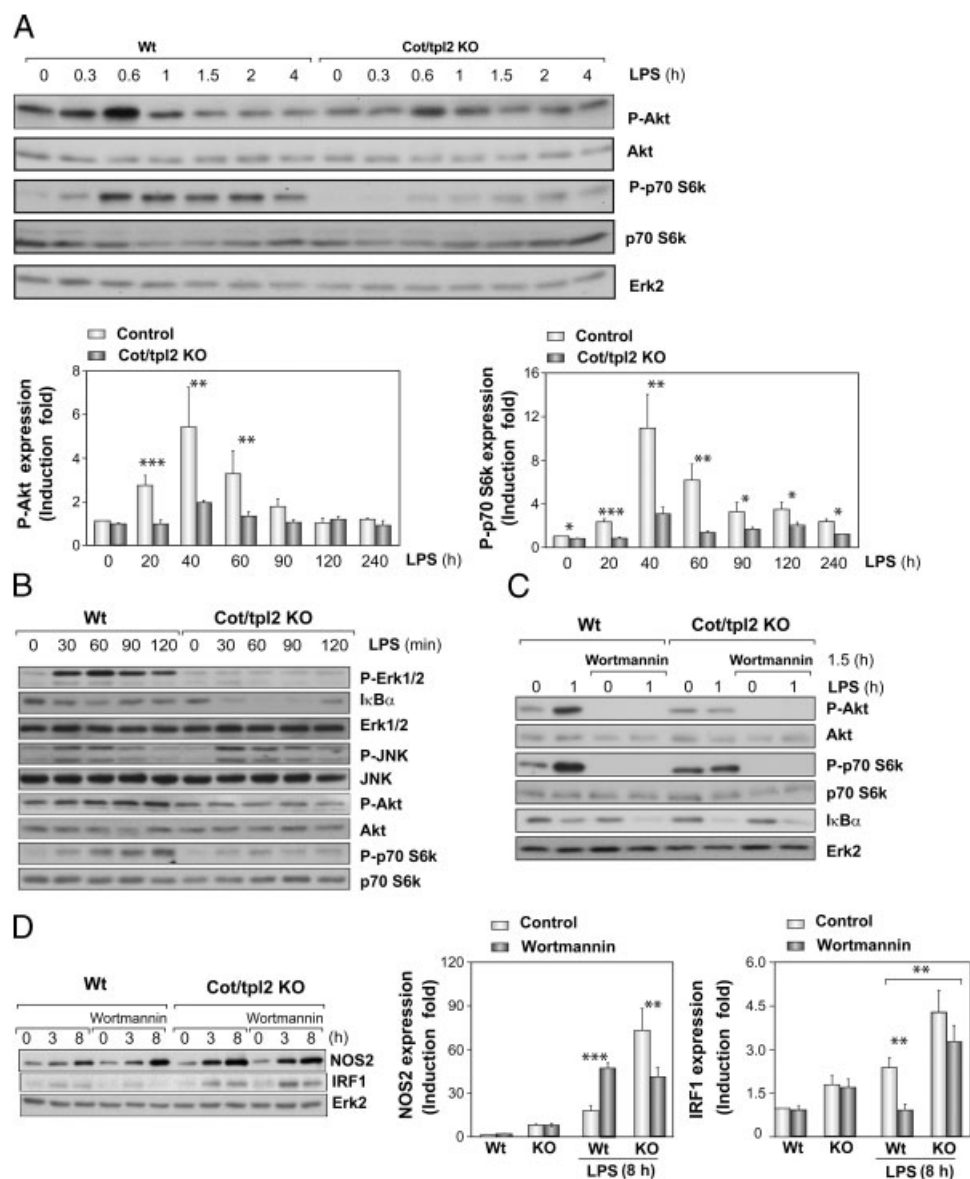


**Figure 2.** Cot/tpl2 modulates the activation of multiple LPS-induced intracellular pathways. (A) WT and Cot/tpl2 KO BMDMs were stimulated with LPS (300 ng/mL) for the periods of time indicated and the levels of Cot/tpl2, P-Erk1/2, P-p38α, P-JNK, IκBα and Erk2 were determined in Western blots. The graphs represent the means±SD ( $n = 3$ ) of P-p38α, P-JNK and IκBα fold induction relative to the WT 0 time point after normalizing the values to total Erk2. Data presented were analysed with Student's *t*-test. Values were taken to be statistically significant at  $p < 0.05$  (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). (B) WT and Cot/tpl2 KO BMDMs were treated as described in (A), and cell extracts were analysed in Western blots using antibodies raised against P-Tyr701 STAT1α/β, STAT1α/β and Erk2. (C) WT and Cot/tpl2 KO BMDMs stimulated for 15 min with IFN-β (300 U/mL) or with IFN-γ (10 ng/mL) were analysed in Western blots using antibodies raised against P-Tyr701 STAT1α/β and STAT1α/β. (D) WT and Cot/tpl2 KO BMDMs were stimulated with LPS (300 ng/mL) plus IFN-β (300 U/mL) or with LPS (300 ng/mL) plus IFN-γ (10 ng/mL) for 8 h and NOS2, IRF1 and Erk2 expression was determined in Western blots. (A–D) Forty micrograms of protein were loaded on each lane. One representative experiment of three is shown.

suggests that a basal level of PI3K activity is required to attain optimal expression of NOS2 protein. Moreover, wortmannin treatment decreased IRF1 induction in LPS-stimulated WT BMDMs, but not in LPS-stimulated Cot/tpl2 KO wortmannin (Fig. 3D).

#### Cot/tpl2 KD BMDMs reproduce the phenotype of Cot/tpl2 KO BMDMs

Inhibition of MKK1 activity, by preincubation with PD 0325901, reduced Ser473 Akt and Thr389 p70 S6k phosphorylation



**Figure 3.** Akt and 70 S6k phosphorylation in LPS-stimulated WT and Cot/tpl2 KO macrophages. (A) P-Ser473 Akt and P-Thr389 p70 S6k were assessed in WT and Cot/tpl2 KO BMDMs stimulated with LPS (300 ng/mL) for the times indicated. Akt, S6k and Erk2 levels were determined as a protein loading control. The graphs represent the means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) of P-Ser473 Akt and P-Thr389 p70 S6k fold induction relative to the WT 0 time point, after normalizing the values with total Akt and total p70 S6k, respectively. Data presented were analysed with Student's *t*-test. Values were taken to be statistically significant at  $p < 0.05$  (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). (B) WT and Cot/tpl2 KO PMs were stimulated with LPS (300 ng/mL) for the indicated times and the levels of P-Erk1/2, IκBα, Erk2, P-JNK, JNK, P-Ser473 Akt, Akt, P-Thr389 p70 S6k and p70 S6k were determined in Western blots. (C) WT and Cot/tpl2 KO BMDMs were preincubated with wortmannin (230 nM) for 30 min prior to stimulation with LPS (300 ng/mL) for 1 h, after which the levels of P-Ser473 Akt, Akt, P-Thr389 p70 S6k, p70 S6k, IκBα and Erk2 were determined in Western blots. (D) WT and Cot/tpl2 KO BMDMs were preincubated for 30 min with wortmannin, stimulated with LPS as indicated in (C) and maintained for 3 and 8 h. NOS2 and IRF1 were determined in Western blots. Erk2 levels were determined as a protein loading control. The graphs represent the means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) of NOS2 and IRF1 fold induction at 0 and 8 h following stimulation, relative to the WT 0 time point after normalizing the values with total Erk2. Data presented were analysed with Student's *t*-test. Values were taken to be statistically significant at  $p < 0.05$  (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). (A–D) Forty micrograms of protein were loaded on each lane. One representative experiment of three is shown.

(Supporting Information Fig. S6). Furthermore, the complete blockage of P-Erk1/2 levels by PD 0325901 also increased both IRF1 and NOS2 expression, although the enhanced expression of NOS2 by PD 0325901 treatment was not as great as that observed in Cot/tpl2 KO (Supporting Information Fig. S6). Similar data were observed when LPS-stimulated WT BMDMs were preincu-

bated with UO126 (10  $\mu$ M, data not shown). The complete blockage of Erk1/2 activity, by PD 0325901 treatment, increased  $2.12 \pm 0.2$ -fold ( $p < 0.01$ ) and  $1.65 \pm 0.2$ -fold ( $p < 0.01$ ) NOS2 expression following respectively 3 and 8 h LPS stimulation of WT BMDMs, but Cot/tpl2 deficiency enhanced seven-fold and four-fold the expression of NOS2 following the stimulation of

BMDMs with LPS for respectively 3 and 8 h (Fig. 1D). Thus, we also examined Akt and p70 S6k phosphorylation and NOS2 expression in LPS-stimulated Cot/tpl2 KD BMDMs. These cells express Cot/tpl2 with a point mutation, in which the lysine responsible for ATP binding (Lys 167) is replaced by Arg and thereby does not have kinase activity. Cot/tpl2 KD protein could be also detected in Cot/tpl2 KD BMDMs, although lower expression levels of Cot/tpl2 KD compared to Cot/tpl2 WT were observed (Supporting Information Fig. S6). In this context, it is known that Cot/tpl2 autophosphorylates on several residues [21, 22]; thus it is possible that the autophosphorylation state of Cot/tpl2 affects its protein expression levels, but also it cannot be excluded the possibility that the antibody recognized with different affinity both forms of Cot/tpl2. As expected, stimulation of Cot/tpl2 KD BMDMs with LPS did not increase Erk1/2 phosphorylation and was concomitant with an impaired phosphorylation of Ser473 Akt and Thr389 p70 S6k (Supporting Information Fig. S6). Both, LPS-stimulated Cot/tpl2 KD and Cot/tpl2 KO BMDMs showed similar levels of NOS2 expression, but higher than LPS-activated WT BMDMs (Supporting Information Fig. S6). These data suggest that a basal level of Erk1/2 activity is required to attain optimal expression of NOS2. Furthermore, increased levels of IRF1 and decreased COX2 expression was also observed in Cot/tpl2 KD BMDMs following LPS stimulation in comparison to LPS-treated WT BMDMs (Supporting Information Fig. S6).

### Cot/tpl2 controls Akt phosphorylation and NOS2 expression in polyI:C/zymosan-stimulated BMDMs

We next investigated whether Cot/tpl2 also controls Akt activation after engagement of other TLRs. WT and Cot/tpl2 KO BMDMs were stimulated with polyI:C to activate TLR3, a receptor that is incapable of recruiting MyD88 and which signals through TRIF [3]. In agreement with previous data [28], Cot/tpl2 deficiency impaired Erk1/2 phosphorylation in polyI:C-stimulated Cot/tpl2 KO BMDMs (Fig. 4A); in addition, further decreased I $\kappa$ B $\alpha$  expression and P-Ser473 Akt levels were observed in polyI:C-stimulated Cot/tpl2 KO BMDMs versus WT counterparts. Cot/tpl2 deficiency also enhanced the levels of NOS2, IRF1 and P-Tyr701 STAT1 $\alpha$ / $\beta$ , but decreased COX2 expression (Fig. 4B). Zymosan-activated macrophages do not utilize the TRIF-, but the MyD88-dependent pathway. Cot/tpl2 KO BMDMs treated with zymosan showed reduced P-Erk1/2 or P-Ser473 Akt levels, concomitantly with a further reduction of I $\kappa$ B $\alpha$  expression in comparison with zymosan-stimulated WT BMDMs (Fig. 4C). Further more, Cot/tpl2 also diminished NOS2 and IRF1 expression and it participated in the COX2 induction in zymosan-stimulated BMDMs. Nevertheless, zymosan administration had little effect on Tyr701 STAT1 $\alpha$ / $\beta$  phosphorylation in both Cot/tpl2 KO and WT BMDMs (Fig. 4D). Of note, Cot/tpl2 deficiency did not affect Ser473 Akt or T389 p70 S6k phosphorylation in IL-10 stimulated BMDMs (Fig. 4E).

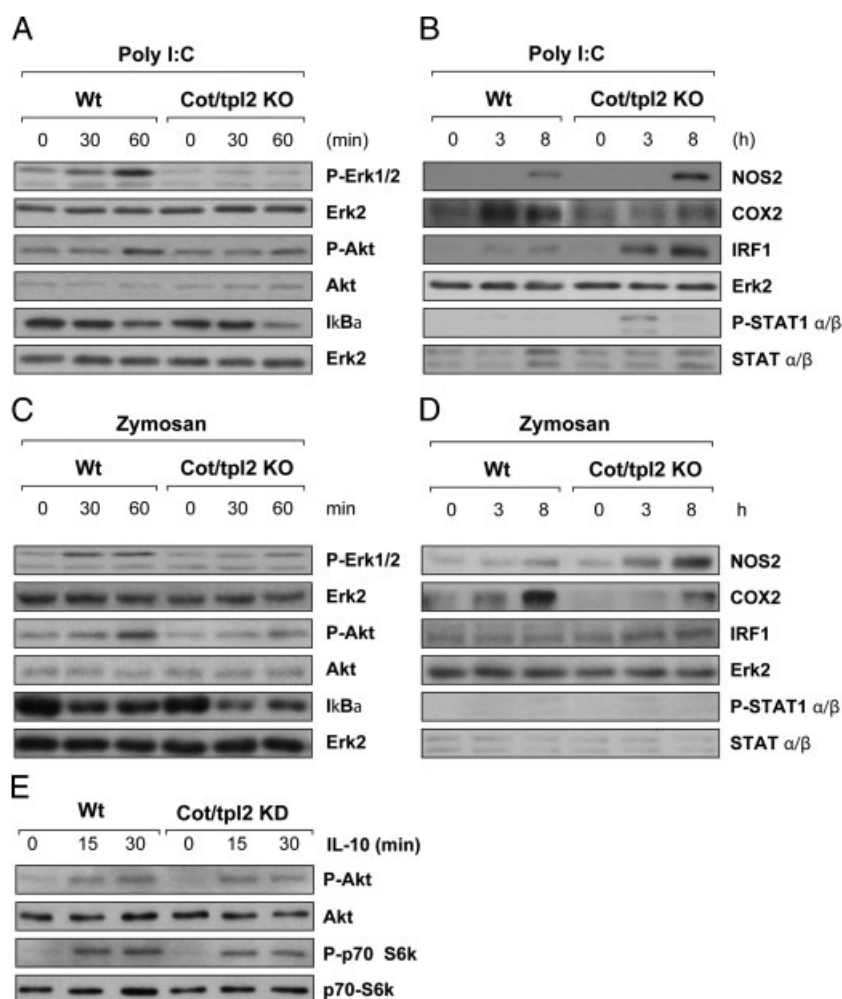
## Discussion

We describe here a novel role for Cot/tpl2 in activating the Akt-p70 S6k pathway following TLR stimulation. When activated by specific ligands, different TLRs utilize distinct adaptors to initiate intracellular signalling, thereby ensuring the specificity of their response (reviewed in [1]). Nonetheless, the control of TLR-induced Akt phosphorylation by Cot/tpl2 is independent of specific adaptors such as MyD88 or TRIF, since a deficient phosphorylation of Akt and p70 S6k has been observed in Cot/tpl2-deficient cells following TLR4, TLR3 or TLR2/6 activation. TLR4 signals through both MyD88 and TRIF adaptors, TLR3 does not signal through the MyD88 adaptor and TLR2/TLR6 signalling does not utilize TRIF [1]. Cot/tpl2 achieves this control via its kinase activity, because cells expressing Cot/tpl2 KD, or WT macrophages in the presence of PD 0325901, also exhibit impaired TLR activation of Akt and p70 S6k. Furthermore, this novel attribute of Cot/tpl2 in the activation of Akt and p70 S6k is a selective and specific event, since Cot/tpl2 has no effect on the Ser473 Akt phosphorylation or on Thr389 p70 S6k phosphorylation in IL-10-stimulated BMDMs, which utilize a receptor that activates distinct intracellular pathways that the TLR/IL1 receptor super-family [41].

The PI3K-Akt-mTOR-p70 S6k pathway has an established role in restricting pro-inflammatory and promoting anti-inflammatory responses in TLR-stimulated macrophages [7, 8, 42]. The PI3K pathway represses MyD88-dependent activated pathways, increasing the recovery of I $\kappa$ B $\alpha$  expression and downmodulating the phosphorylation state of p38 $\alpha$ , JNK and Erk1/2 in TLR-activated macrophages [4–6]. In agreement with these reports and with the capacity of Cot/tpl2 to control Akt activation described here, Cot/tpl2 deficiency further maintains the activation state of p38 $\alpha$  and JNK and provokes an impaired I $\kappa$ B $\alpha$  recovery in LPS-stimulated macrophages. Furthermore, the presence of wortmannin further decreases I $\kappa$ B $\alpha$  in LPS-stimulated WT macrophages, reaching the levels observed in stimulated Cot/tpl2 KO BMDMs. It should be noted that Cot/tpl2 deficiency also impairs I $\kappa$ B $\alpha$  recovery in mouse embryonic fibroblasts following TNF- $\alpha$  receptor activation [34].

TLR-activated PI3K pathway also represses Erk1/2 phosphorylation [5]; these data suggest that activated Erk1/2 induces its own down-regulation via a negative feedback loop by controlling Akt phosphorylation. Nevertheless, and overall, these data indicate that the capacity of Cot/tpl2-MKK1-Erk1/2 to mediate the TLR-dependent activation of Akt and p70 S6k allows Cot/tpl2 to fine-control the activation state of other signalling pathways.

Several groups have shown that inhibition of the PI3K pathway increases NOS2 expression in TLR-activated macrophages [4–8] and here we show that Cot/tpl2 represses NOS2 expression in LPS stimulated by its capacity to mediate the activation of the PI3K pathway. Of note, in LPS-activated macrophages IKK- $\beta$  deficiency, which is needed to activate Cot/tpl2 [17], confers enhanced NOS2 expression [43]. Nevertheless, Cot/tpl2 modulates the expression of other genes in TLR-activated macrophages independently of its control over Akt phosphorylation. The increased IFN- $\beta$  production in LPS-stimulated Cot/tpl2-deficient BMDMs is reversed by transfection with c-Fos [39], an Erk1/2-dependent transcription factor. In addition, here we show that complete inhibition of Erk1/2 activity,



**Figure 4.** Cot/tpl2 controls Akt phosphorylation and NOS2 expression in BMDMs stimulated with polyI:C or with zymosan. (A and C) WT and Cot/tpl2 KO BMDMs were stimulated with (A) polyI:C (50 µg/mL) or with (C) zymosan (10 µg/mL) for 30 and 60 min and the expression levels of P-Erk1/2, IkBα, P-Ser473 Akt, Akt and Erk2 were determined in Western blots. (B and D) WT and Cot/tpl2 KO BMDMs were stimulated with (B) polyI:C (50 µg/mL) or with (D) zymosan (10 µg/mL) for 3 and 8 h, and the levels of NOS2, COX2, IRF1, Erk2, P-Tyr701 STAT1α/β and STAT1α/β were determined in Western blots. (E) WT and Cot/tpl2 KO BMDMs were stimulated with IL-10 (50 ng/mL) for 15 min and the levels of P-Ser473 Akt, Akt, P-Thr389 p70 S6k and p70 S6k were determined in Western blots. (A–E) Forty micrograms of protein were loaded on each lane. One representative experiment of three is shown.

but not the complete inhibition of Akt phosphorylation, increases IRF1 expression levels in LPS-stimulated WT BMDMs. Furthermore, Cot/tpl2-MKK1-Erk1/2 activity is also required for the expression of TNF-α and COX2. Erk1/2 activity is essential to process pre-TNF-α to its mature secreted form in LPS-stimulated macrophages [36] and in the induction of COX2 by LPS, Erk1/2 activity is required due to its capacity to ultimately control CREB phosphorylation, a key regulator of COX2 transcription [32]. Thus, Cot/tpl2 refines macrophage activation, mediating the expression of genes such as TNF-α, COX2 and CXCL-1, but down-modulating the expression of other ones, such as NOS2, IRF1, IFN-β, IFN-γ, IL-12, CXCL-10 and CCL5 (Supporting Information Fig. S7). It is noteworthy that COX2 is regulated by Cot/tpl2 in an opposite way to that of NOS2, suggesting that Cot/tpl2 is providing a positive input in the synthesis of bioactive lipid mediators that, at the end of the inflammatory process, might contribute to the resolution of inflammation. Unravelling whether Cot/tpl2 regulates the expression of prostaglandin synthases, including the switch to

cyclopentenone derivatives of prostaglandins, might add new clues to understand the pivotal role played by Cot/tpl2 in the commitment of the inflammatory response as a whole.

In conclusion, these data indicate a novel role for Cot/tpl2 in mediating TLR activation of the Akt-mTOR-p70 S6k pathway that ultimately affects the activation state of macrophages.

## Materials and methods

### Animals, preparation of PMs and BMDMs, and NO measurement

C57BL/6J WT, C57BL/6J Cot/tpl2 KO and littermates were produced from heterozygotic mice (Cot/tpl2 KO<sup>+/-</sup> × Cot/tpl2 KO<sup>+/-</sup>). All animals received care according to methods approved



under institutional guidelines for the care and use of laboratory animals in research. PMs and BMDMs were obtained as previously described [44], and cells were then stimulated with: LPS (*Salmonella typhimurium*, Sigma L726), IFN- $\beta$  (PeproTech), IFN- $\gamma$  (PeproTech), polyI:C (Invivogen), zymosan (Invivogen) or IL-10 (PeproTech). Wortmannin was purchased from Calbiochem, PD 0325901 was a gift from Prof. Philip Cohen, Dundee. The concentration of NO in cell supernatant was measured as previously described [44].

## Western blot analysis

Cell extracts were examined by Western blotting as described previously [45], using primary antibodies raised against the following proteins: NOS2, COX2, JNK (p46 JNK), IRF1, Erk2, Cot/tpl2, Akt1/2, P-Thr389 p70 S6k and p70 S6k (Santa Cruz Biotechnology), P-Erk1/2, P-p38 $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , P-Ser473 Akt1/2, P-Tyr701 Stat1 $\alpha$ / $\beta$ , STAT1 $\alpha$ / $\beta$  (Cell Signaling) and P-JNK (p46 P-JNK and p54 P-JNK, Promega). The secondary antibodies used were raised against rabbit (Cell Signaling), goat (DAKO) and mouse (Amersham Biosciences). The experiments shown have been performed at least three times.

## RNA extraction and quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from PMs using Trizol Reagent (Invitrogen). Quantitative RT-PCR was performed using the NOS2 and 18S rRNA primer/probe mix (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems) as previously described [35]. NOS2 expression levels were normalized to levels of 18S rRNA expression in each assay.

## Statistical analysis

The graphs data presented, as the means+SD, were analysed with Student's *t*-test. Values were taken to be statistically significant at  $p < 0.05$  (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

**Acknowledgements:** PD 0325901 was a gift from Prof. Philip Cohen, Dundee. We thank R. Encinar and L. Molero and MC. Moreno for the technical work. This work was supported by SAF 2008-00819 and Mutua Madrileña grants. M.L.P. is the recipient of FPU-UAM fellowship.

**Conflict of interest:** The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

## References

- O'Neill, L. A. and Bowie, A. G., The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2007. 7: 353–364.
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K. and Akira, S., Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 2002. 169: 6668–6672.
- Hoebe, K., Janssen, E. M., Kim, S. O., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., Han, J. and Beutler, B., Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat. Immunol.* 2003. 4: 1223–1229.
- Diaz-Guerra, M. J., Castrillo, A., Martin-Sanz, P. and Bosca, L., Negative regulation by phosphatidylinositol 3-kinase of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *J. Immunol.* 1999. 162: 6184–6190.
- Guha, M. and Mackman, N., The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* 2002. 277: 32124–32132.
- Fukao, T. and Koyasu, S., PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol.* 2003. 24: 358–363.
- Weichhart, T. and Saemann, M. D., The multiple facets of mTOR in immunity. *Trends Immunol.* 2009. 30: 218–226.
- Weichhart, T., Costantino, G., Poglitsch, M., Rosner, M., Zeyda, M., Stuhlmeier, K. M., Kolbe, T. et al., The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity* 2008. 29: 565–577.
- Laird, M. H., Rhee, S. H., Perkins, D. J., Medvedev, A. E., Piao, W., Fenton, M. J. and Vogel, S. N., TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. *J. Leukoc. Biol.* 2009. 85: 966–977.
- Akira, S. and Takeda, K., Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2004. 4: 499–511.
- Heissmeyer, V., Krappmann, D., Wulczyn, F. G. and Scheidereit, C., NF-kappaB p105 is a target of IkappaB kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes. *EMBO J.* 1999. 18: 4766–4778.
- Salmeron, A., Janzen, J., Soneji, Y., Bump, N., Kamens, J., Allen, H. and Ley, S. C., Direct phosphorylation of NF-kappaB p105 by the IkappaB kinase complex on serine 927 is essential for signal-induced p105 proteolysis. *J. Biol. Chem.* 2001. 276: 22215–22222.
- Orian, A., Gonen, H., Bercovich, B., Fajerman, I., Eytan, E., Israel, A., Mercurio, F. et al., SCF(beta)-TRCP ubiquitin ligase-mediated processing of NF-kappaB p105 requires phosphorylation of its C-terminus by IkappaB kinase. *EMBO J.* 2000. 19: 2580–2591.
- Vallabhapurapu, S. and Karin, M., Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 2009. 27: 693–733.
- Belich, M. P., Salmeron, A., Johnston, L. H. and Ley, S. C., TPL-2 kinase regulates the proteolysis of the NF-kappaB-inhibitory protein NF-kappaB1 p105. *Nature* 1999. 397: 363–368.
- Waterfield, M., Jin, W., Reiley, W., Zhang, M. and Sun, S. C., IkappaB kinase is an essential component of the Tpl2 signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 2004. 24: 6040–6048.
- Waterfield, M. R., Zhang, M., Norman, L. P. and Sun, S. C., NF-kappaB1/p105 regulates lipopolysaccharide-stimulated MAP kinase signaling by governing the stability and function of the Tpl2 kinase. *Mol. Cell* 2003. 11: 685–694.
- Lang, V., Symons, A., Watton, S. J., Janzen, J., Soneji, Y., Beinke, S., Howell, S. and Ley, S. C., ABIN-2 forms a ternary complex with TPL-2 and NF-kappa B1 p105 and is essential for TPL-2 protein stability. *Mol. Cell Biol.* 2004. 24: 5235–5248.
- Papoutsopoulou, S., Symons, A., Tharmalingham, T., Belich, M. P., Kaiser, F., Kioussis, D., O'Garra, A. et al., ABIN-2 is required for optimal activation

- of Erk MAP kinase in innate immune responses. *Nat. Immunol.* 2006. 7: 606–615.
- 20 Verstrepen, L., Carpentier, I., Verhelst, K. and Beyaert, R., ABINs: A20 binding inhibitors of NF-kappaB and apoptosis signaling. *Biochem. Pharmacol.* 2009. 78: 105–114.
  - 21 Stafford, M. J., Morrice, N. A., Pegg, M. W. and Cohen, P., Interleukin-1 stimulated activation of the COT catalytic subunit through the phosphorylation of Thr290 and Ser62. *FEBS Lett.* 2006. 580: 4010–4014.
  - 22 Cho, J. and Tschlis, P. N., Phosphorylation at Thr-290 regulates Tpl2 binding to NF-kappaB1/p105 and Tpl2 activation and degradation by lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005. 102: 2350–2355.
  - 23 Robinson, M. J., Beinke, S., Kouroumalis, A., Tschlis, P. N. and Ley, S. C., Phosphorylation of TPL-2 on serine 400 is essential for lipopolysaccharide activation of extracellular signal-regulated kinase in macrophages. *Mol. Cell Biol.* 2007. 27: 7355–7364.
  - 24 Handoyo, H., Stafford, M. J., McManus, E., Baltzis, D., Pegg, M. and Cohen, P., IRAK1-independent pathways required for the interleukin-1-stimulated activation of the Tpl2 catalytic subunit and its dissociation from ABIN2. *Biochem. J.* 2009. 424: 109–118.
  - 25 Beinke, S., Deka, J., Lang, V., Belich, M. P., Walker, P. A., Howell, S., Smerdon, S. J. et al., NF-kappaB1 p105 negatively regulates TPL-2 MEK kinase activity. *Mol. Cell Biol.* 2003. 23: 4739–4752.
  - 26 Beinke, S., Robinson, M. J., Hugunin, M. and Ley, S. C., Lipopolysaccharide activation of the TPL-2/MEK/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade is regulated by IkappaB kinase-induced proteolysis of NF-kappaB1 p105. *Mol. Cell Biol.* 2004. 24: 9658–9667.
  - 27 Gandara, M. L., Lopez, P., Hernando, R., Castano, J. G. and Alemany, S., The COOH-terminal domain of wild-type Cot regulates its stability and kinase specific activity. *Mol. Cell Biol.* 2003. 23: 7377–7390.
  - 28 Banerjee, A., Gugasyan, R., McMahon, M. and Gerondakis, S., Diverse Toll-like receptors utilize Tpl2 to activate extracellular signal-regulated kinase (ERK) in hemopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006. 103: 3274–3279.
  - 29 Loniewski, K. J., Patial, S. and Parameswaran, N., Sensitivity of TLR4- and -7-induced NF kappa B1 p105-TPL2-ERK pathway to TNF-receptor-associated-factor-6 revealed by RNAi in mouse macrophages. *Mol. Immunol.* 2007. 44: 3715–3723.
  - 30 Dumitru, C. D., Ceci, J. D., Tsatsanis, C., Kontoyiannis, D., Stamatakis, K., Lin, J. H., Patriotis, C. et al., TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 2000. 103: 1071–1083.
  - 31 Caivano, M., Rodriguez, C., Cohen, P. and Alemany, S., 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 regulates endogenous Cot MAPK kinase 1 activity induced by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 2003. 278: 52124–52130.
  - 32 Eliopoulos, A. G., Dumitru, C. D., Wang, C. C., Cho, J. and Tschlis, P. N., Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *EMBO J.* 2002. 21: 4831–4840.
  - 33 Rodriguez, C., Pozo, M., Nieto, E., Fernandez, M. and Alemany, S., TRAF6 and Src kinase activity regulates Cot activation by IL-1. *Cell Signal.* 2006. 18: 1376–1385.
  - 34 Das, S., Cho, J., Lambert, I., Kelliher, M. A., Eliopoulos, A. G., Du, K. and Tschlis, P. N., Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF-kappaB in a cell-type and stimulus-specific manner. *J. Biol. Chem.* 2005. 280: 23748–23757.
  - 35 Soria Castro, I., Krzyzanowska, A., Lopez Pelaez, M., Regadera, J., Ferrer, G., Montoliu, L., Rodriguez-Ramos, R. et al., COT/TP2 (MAP3K8) mediates myeloperoxidase activity and hypernociception following peripheral inflammation. *J. Biol. Chem.* 2010. 285: 33805–33815.
  - 36 Rousseau, S., Papoutsopoulou, M., Symons, A., Cook, D., Lucocq, J. M., Prescott, A. R., O'Garra, A. et al., TPL2-mediated activation of ERK1 and ERK2 regulates the processing of pre-TNF alpha in LPS-stimulated macrophages. *J. Cell Sci.* 2008. 121: 149–154.
  - 37 Lowenstein, C. J. and Padalko, E., iNOS (NOS2) at a glance. *J. Cell Sci.* 2004. 117: 2865–2867.
  - 38 Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D. and Taniguchi, T., The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 2008. 26: 535–584.
  - 39 Kaiser, F., Cook, D., Papoutsopoulou, S., Rajsbaum, R., Wu, X., Yang, H. T., Grant, S. et al., TPL-2 negatively regulates interferon-beta production in macrophages and myeloid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2009. 206: 1863–1871.
  - 40 Sugimoto, K., Ohata, M., Miyoshi, J., Ishizaki, H., Tsuboi, N., Masuda, A., Yoshikai, Y. et al., A serine/threonine kinase, Cot/Tpl2, modulates bacterial DNA-induced IL-12 production and Th cell differentiation. *J. Clin. Invest.* 2004. 114: 857–866.
  - 41 Kotenko, S. V., Krause, C. D., Izotova, L. S., Pollack, B. P., Wu, W. and Pestka, S., Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *EMBO J.* 1997. 16: 5894–5903.
  - 42 Androulidaki, A., Iliopoulos, D., Arranz, A., Doxaki, C., Schworer, S., Zacharioudaki, V., Margioris, A. N. et al., The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity* 2009. 31: 220–231.
  - 43 Fong, C. H., Beben, M., Didierlaurent, A., Nebauer, R., Hussell, T., Broide, D., Karin, M. and Lawrence, T., An antiinflammatory role for IKKbeta through the inhibition of "classical" macrophage activation. *J. Exp. Med.* 2008. 205: 1269–1276.
  - 44 Traves, P. G., Hortelano, S., Zeini, M., Chao, T. H., Lam, T., Neuteboom, S. T., Theodorakis, E. A. et al., Selective activation of liver X receptors by acanthoic acid-related diterpenes. *Mol. Pharmacol.* 2007. 71: 1545–1553.
  - 45 Rodriguez, C., Lopez, P., Pozo, M., Duce, A. M., Lopez-Pelaez, M., Fernandez, M. and Alemany, S., COX2 expression and Erk1/Erk2 activity mediate Cot-induced cell migration. *Cell Signal.* 2008. 20: 1625–1631.

**Abbreviations:** BMDMs: BM-derived macrophages · NOS2: NO synthase 2 · PMs: peritoneal macrophages

**Full correspondence:** Dr. Susana Alemany, IIB.CSIC-UAM, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain  
Fax: +34-91-585-4401  
e-mail: salemany@iib.uam.es

**See accompanying Commentary:**  
<http://dx.doi.org/10.1002/eji.201141670>

Received: 27/9/2010  
Revised: 14/3/2011  
Accepted: 31/3/2011  
Article accepted online: 5/4/2011

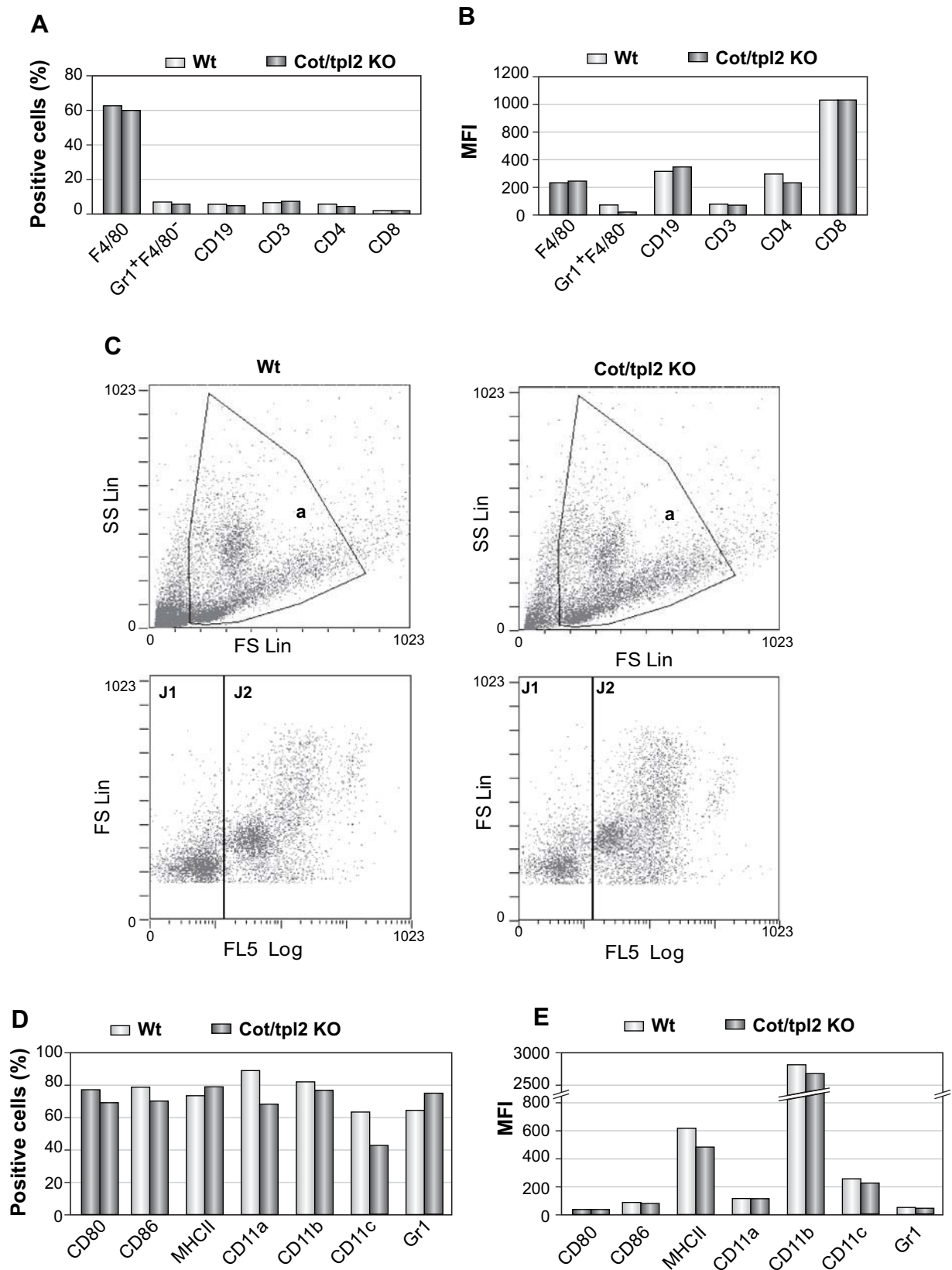


# European Journal of Immunology

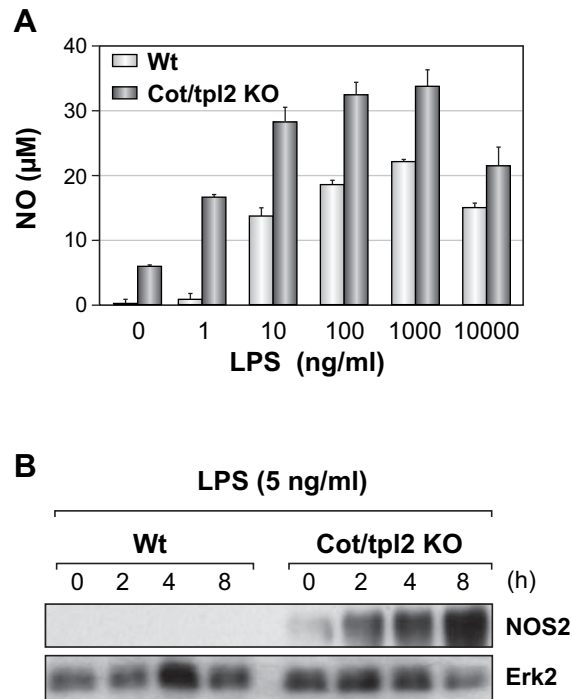
**Supporting Information**  
**for**  
**DOI 10.1002/eji.201041101**

**Cot/tpl2 activity is required for TLR-induced activation of the Akt p70 S6k pathway in macrophages: Implication in NO synthase 2 expression**

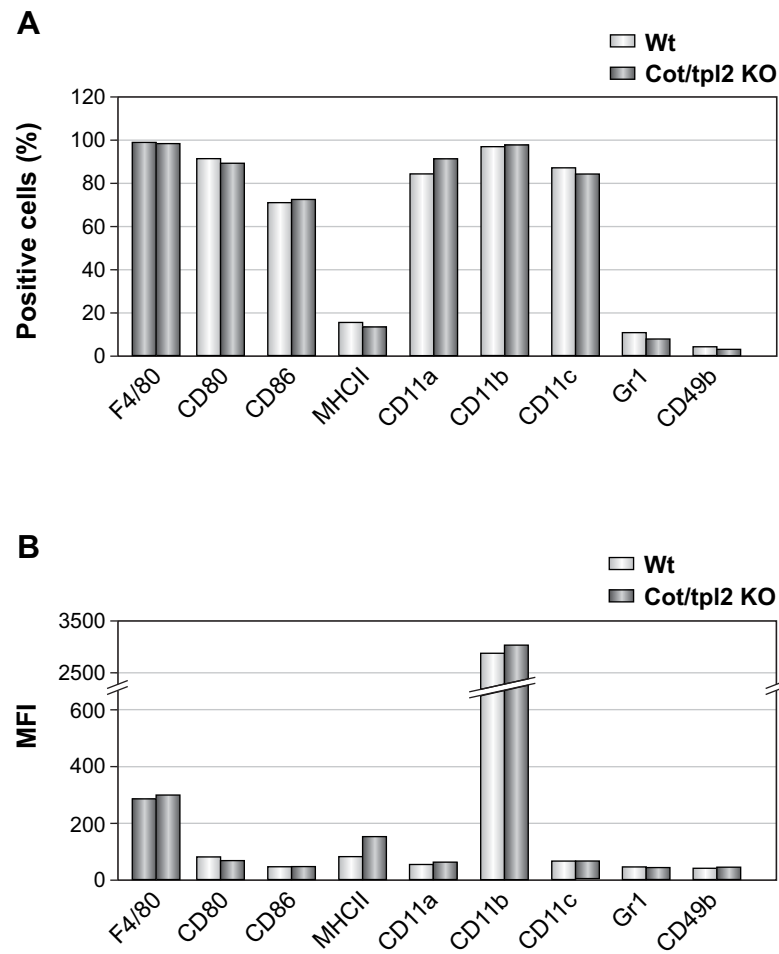
Marta López-Peláez, Irene Soria-Castro, Lisardo Boscá, Margarita Fernández and Susana Alemany



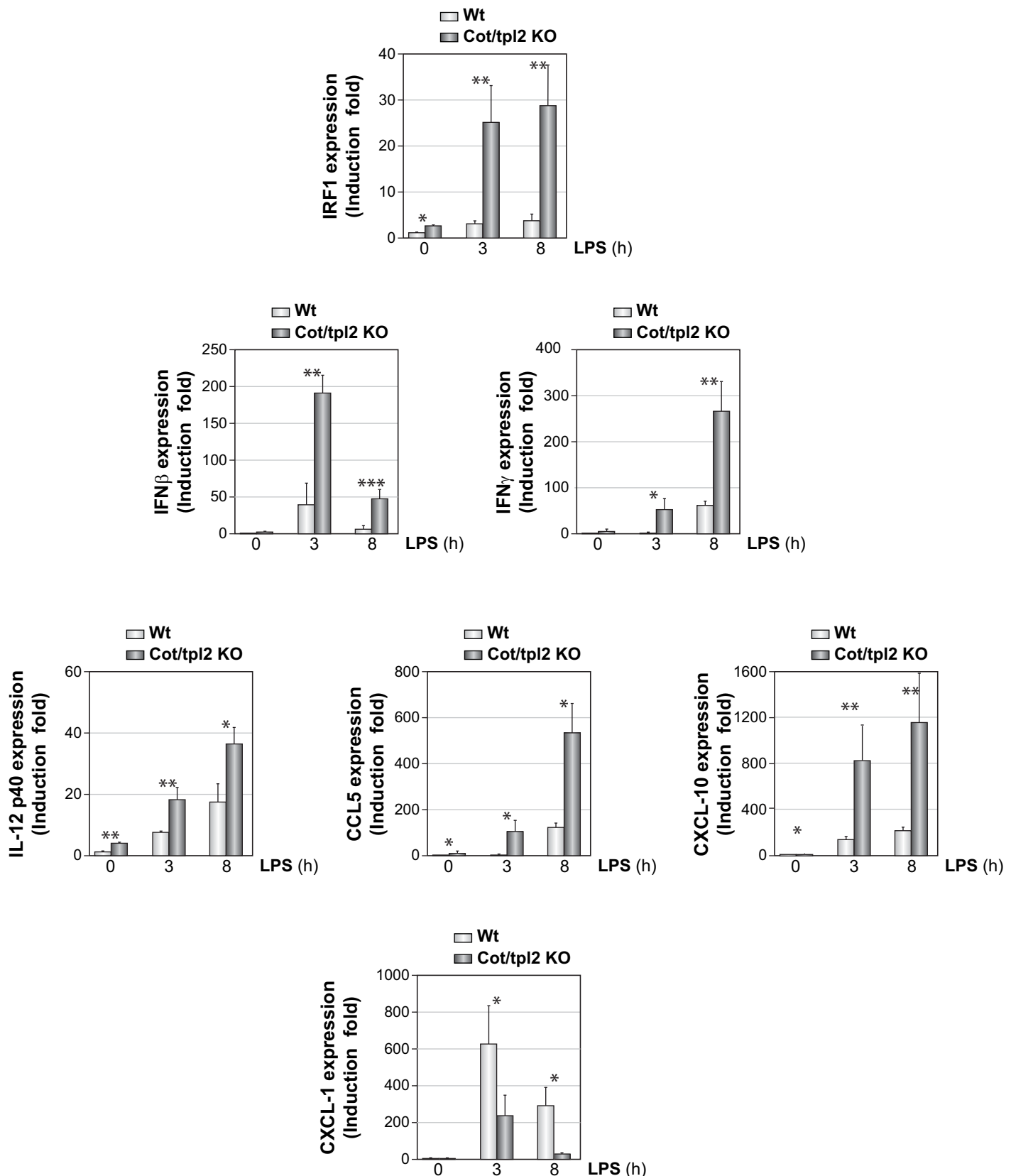
**Figure S1. Cytometry analysis of thioglycolate-elicited peritoneal macrophages from Wt and Cot/tpl2 KO mice.** **A)** Histograms represent the percentage of F4/80<sup>+</sup>, GR1<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup>, CD19, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells isolated from the peritoneum of Wt and Cot/tpl2 KO mice. **B)** Quantitative analysis of fluorescence staining for F4/80, GR1(F4/80<sup>-</sup>), CD19, CD3, CD4 and CD8 indicated in A. **C)** Representative side scatter (SS Lin) and forward scatter (FS Lin) profile showing Wt and Cot/tpl2 KO peritoneal isolated cells (region **a**). Representative F4/80<sup>+</sup> cell region (region J2, FL5<sup>+</sup>) gated from region **a** for further analysis. **D)** Histograms represent the percentage of the F4/80<sup>+</sup> cells isolated from the peritoneum of Wt and Cot/tpl2 KO mice positive for CD80, CD86, MHCII, CD11a, CD11b, CD11c and GR1. **E)** Quantitative analysis of fluorescence staining for CD80, CD86, MHCII, CD11a, CD11b, CD11c and GR1 indicated in D. **A-E)** Values represent one representative experiment of the 3 performed.



**Figure S2. Dose curve response of LPS-induced NOS2 expression in Wt and Cot/tpl2 KO peritoneal macrophages.** **A)** Culture supernatants from Wt and Cot/tpl2 KO macrophages were collected 24 h after stimulation with the indicated concentrations of LPS and NO levels were measured. The mean + SD of 3 independent experiments is shown. **B)** NOS2 expression in Wt and Cot/tpl2 KO macrophages stimulated with LPS (5 ng/ml) for the indicated lengths of time. Erk2 levels were determined as a protein loading control. Similar results were obtained in three separate experiments.

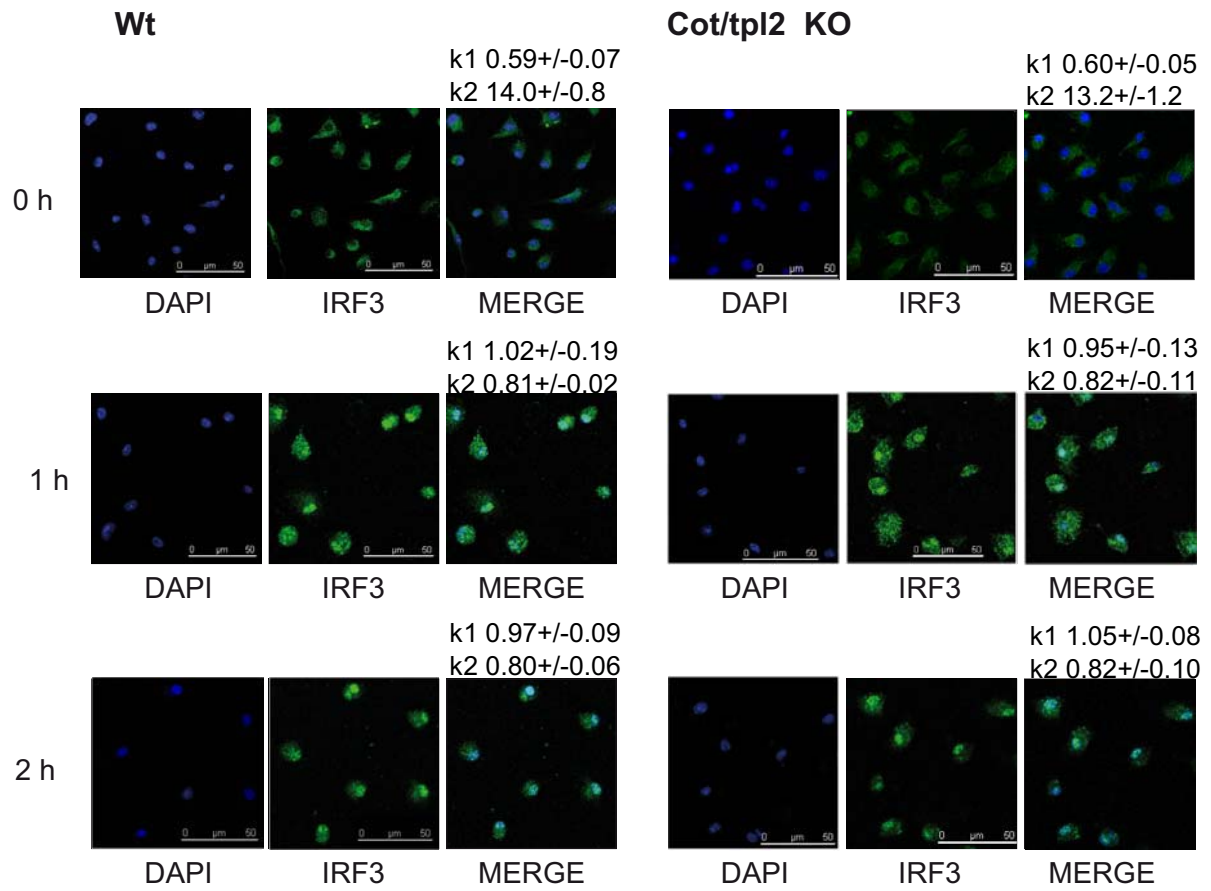


**Figure S3. Cytometry analysis of Wt and Cot/tpl2 KO bone marrow derived macrophages cells. A)** Histograms represent the percentage of Wt and Cot/tpl2 KO BMDM positive for F4/80, CD80, CD86, MHCII, CD11a, CD11b, CD11c, GR1 and CD49b. **B)** Quantitative analysis of fluorescence staining for CD80, CD86, MHCII, CD11a, CD11b, CD11c, GR1 and CD49b indicated in A. **A,B)** Values represent one representative experiment of the 3 performed.

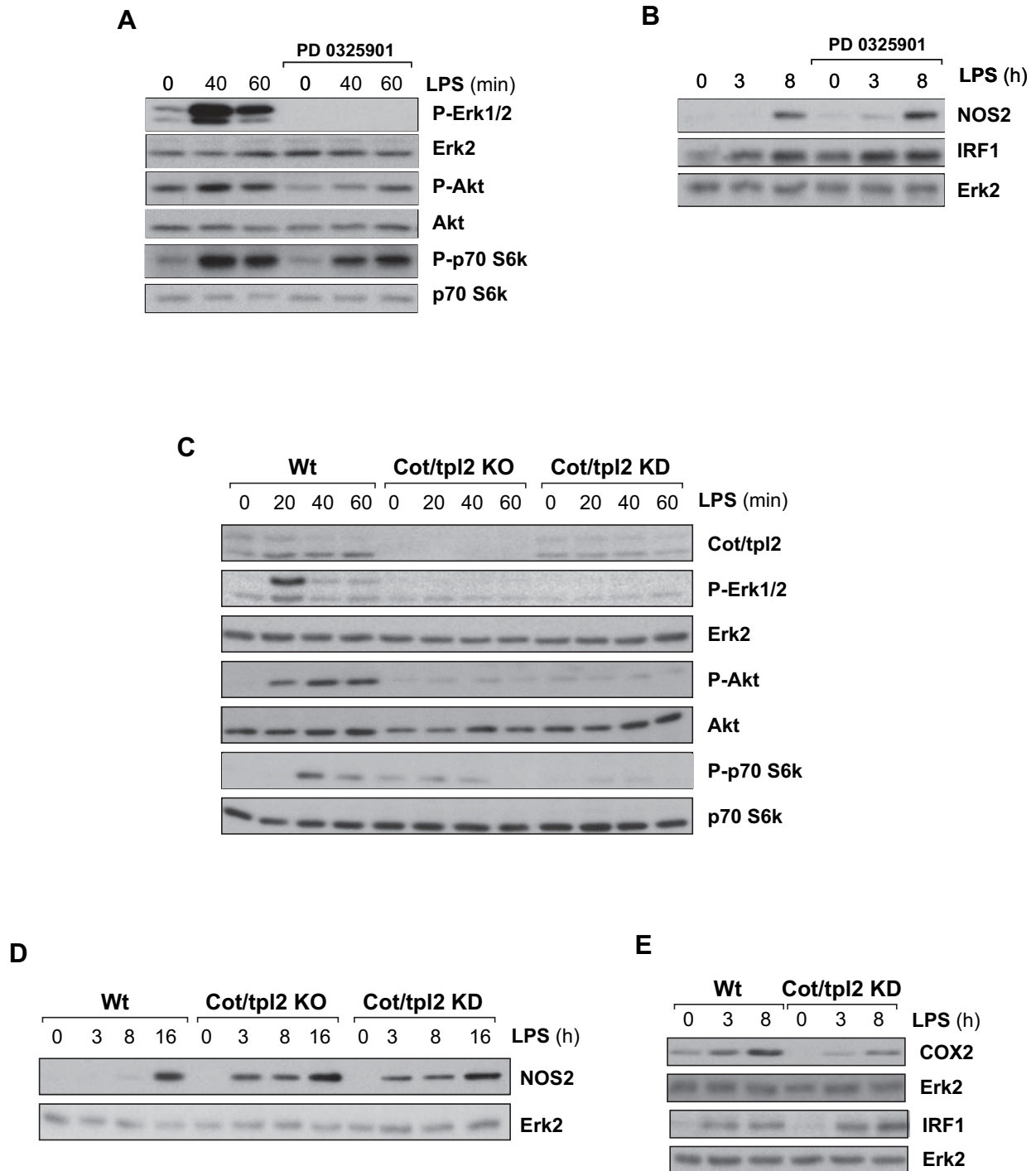


**Figure S4. Induction of cytokines and chemokines transcripts in LPS-stimulated Wt and Cot/tpl2 KO bone marrow derived macrophages.** IRF1, IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL12 p40, CCL5, CXCL10 and CXCL1 mRNA levels were assessed by qRT-PCR analysis in Wt and Cot/tpl2 KO BMDM stimulated with LPS (300 ng/ml) for the times indicated. IRF1, IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL12 p40, CCL5, CXCL1 and 18S rRNA specific TAQMAN primers (Applied Biosystems) were used. CXCL-10 transcripts were determined by Sybr green qRT-PCR using sense primer 5' GCT GGG TCT GAG TGG GAC T and antisense 5' CCC TAT GGC CCT CAT TCT C and the 18S rRNA primers used were sense primer 5' CCA GTA AGT GCG GGT CAT AAG C and antisense 5' CCT CAC TAA ACC ATC CAA TCG G. Expression levels of the different cytokines and chemokines were normalized to levels of 18S rRNA expression in each assay. The mean + SD of 3 independent experiments performed in triplicate is shown as fold induction relative to the Wt 0 time point. Data were analysed with the Students t-test ( $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*).

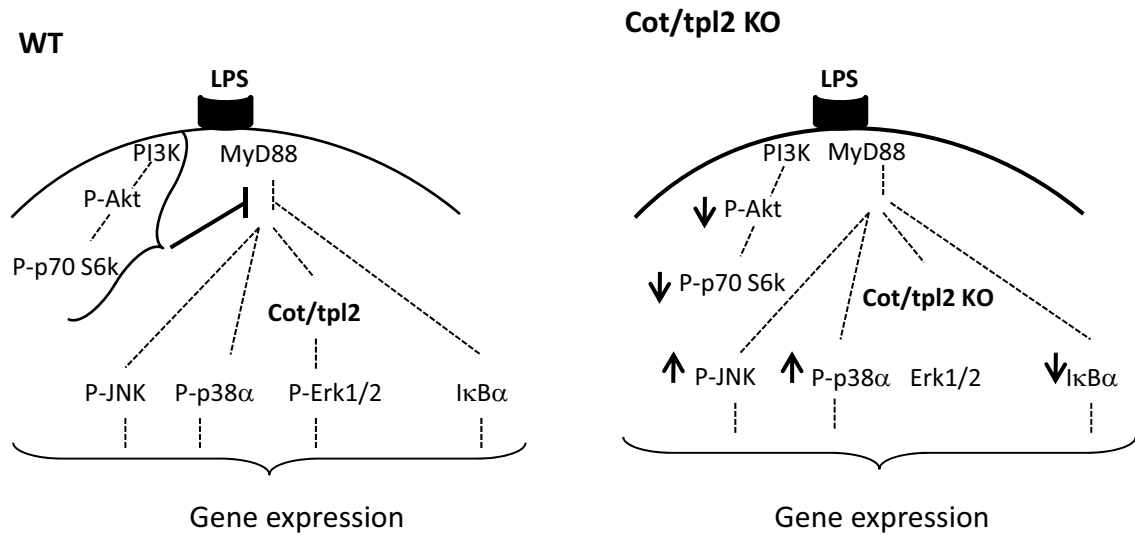




**Figure S5. IRF3 localization in LPS-stimulated Wt and Cot/tpl2 KO bone marrow derived macrophages.** IRF3 immunofluorescence in Wt and Cot/tpl2 KO BMDM stimulated with LPS (300 ng/ml) for 1 and 2 h. Similar intensity of IRF3 expression were observed under the different experimental conditions. The means +/- SD of the overlap coefficients k1 and k2 of 3 independent experiments are also shown.



**Figure S6. NOS2, COX2 and IRF1 expression in LPS-stimulated WT and Cot/tpl2 KD bone marrow derived macrophages.** **A)** Wt BMDM were preincubated with PD 0325901 (0.5  $\mu$ M) for 30 min prior to stimulation with LPS (300 ng/ml) for the indicated times, after which the levels of P-Erk1/2, Erk2, P-Ser473 Akt, Akt, P-Thr389 p70 S6k and p70 S6k were determined in western blots. **B)** NOS2, IRF1 and Erk2 expression in Wt BMDM following a 30 min preincubation with PD 0325901 (0.5  $\mu$ M) and then stimulated with LPS (300 ng/ml) for 3 and 8 h, was determined in western blots. **C)** Wt, Cot/tpl2 KO and Cot/tpl2 KD BMDM were stimulated with LPS (300 ng/ml) for 20, 40 and 60 min, and the expression of Cot/tpl2, P-Erk1/2, P-Ser473 Akt, Akt, P-Thr389 p70 S6k and Erk2 were determined in western blots. **D)** NOS2 and Erk2 expression in Wt, Cot/tpl2 KO and Cot/tpl2 KD BMDM following stimulation with LPS (300 ng/ml) for the indicated times was determined in western blots. **E)** Wt and Cot/tpl2 KD BMDM were stimulated for different lengths of time with LPS (300 ng/ml) and the extracts obtained were analyzed in western blots probed with antibodies against COX2, IRF1 and Erk2. **A-E)** One representative experiment of the 3 performed is shown.



**Figure S7. Cot/tpl2 fine-tunes gene expression in LPS-activated macrophages.** In LPS-stimulated macrophages Cot/tpl2-MKK1-Erk1/2 pathway controls Akt-p70 S6k phosphorylation, a pathway that downmodulates the phosphorylation state of JNK, p38 $\alpha$  and favours I $\kappa$ B $\alpha$  recovery. Thus, Cot/tpl2 modulates gene expression via Erk1/2, but also by fine-controlling the activation state of other signalling pathways.

# Cot/tpl2 (MAP3K8) Mediates Myeloperoxidase Activity and Hypernociception following Peripheral Inflammation<sup>\*[S]</sup>

Received for publication, July 29, 2010 Published, JBC Papers in Press, August 24, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.169409

Irene Soria-Castro<sup>†1</sup>, Agnieszka Krzyzanowska<sup>§</sup>, Marta López Pelaéz<sup>‡</sup>, Javier Regadera<sup>§</sup>, Gema Ferrer<sup>‡</sup>, Lluís Montoliu<sup>¶</sup>, Rosario Rodríguez-Ramos<sup>||</sup>, Margarita Fernández<sup>‡</sup>, and Susana Alemany<sup>‡2</sup>

From the <sup>†</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols,” Consejo Superior de Investigaciones Científicas–Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid 28029, the <sup>§</sup>Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia Facultad Medicina, UAM, Madrid 28029, and the <sup>¶</sup>Departamento de Biología Molecular y Celular Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) and the <sup>||</sup>Departamento Ciencias Médicas, Facultad Medicina, Universidad San Pablo, CEU, Boadilla del Monte, Madrid 28668, Spain

Cot/tpl2 (also known as MAP3K8) has emerged as a new and potentially interesting therapeutic anti-inflammatory target. Here, we report the first study of Cot/tpl2 involvement in acute peripheral inflammation *in vivo*. Six hours after an intraplantar injection of zymosan, Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice showed a 47% reduction in myeloperoxidase activity, concomitant with a 46% lower neutrophil recruitment and a 40% decreased luminol-mediated bioluminescence imaging *in vivo*. Accordingly, Cot/tpl2 deficiency provoked a 25–30% reduction in luminol-mediated bioluminescence and neutrophil recruitment together with a 65% lower macrophage recruitment 4 h following zymosan-induced peritonitis. Significantly impaired levels of G-CSF and GM-CSF and of other cytokines such as TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6, as well as some chemokines such as MCP-1, MIP-1 $\beta$ , and keratinocyte-derived chemokine, were detected during the acute zymosan-induced intraplantar inflammatory response in Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice. Moreover, Cot/tpl2 deficiency dramatically decreased the production of the hypernociceptive ligand NGF at the inflammatory site during the course of inflammation. Most importantly, Cot/tpl2 deficiency significantly reduced zymosan-induced inflammatory hypernociception in mice, with a most pronounced effect of a 50% decrease compared with wild type (WT) at 24 h following intraplantar injection of zymosan. At this time, Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice showed significantly reduced NGF, TNF $\alpha$ , and prostaglandin E<sub>2</sub> levels compared with WT littermates. In conclusion, our study demonstrates an important role of Cot/tpl2 in the NGF, G-CSF, and GM-CSF production and myeloperoxidase activity in the acute inflammatory response process and its implication in inflammatory hypernociception.

Activation of the pattern recognition receptors, which include Toll-like receptors (TLRs),<sup>3</sup> RIG-I-like receptors, NOD-

like receptors, and C-type lectin receptors, by pathogen-associated molecular patterns starts a program that culminates in the development of an inflammatory process (for review, see Ref. 1). TLRs as well as IL-1 receptors, despite their marked differences in their extracellular regions, have a conserved cytoplasmic Toll/IL-1 receptor domain (for review, see Ref. 2). Cot/tpl2, also known as MAP3K8, is the sole MAP3K that activates the MKK1/2-ERK1/2 pathway in response to stimulation of the TLR/IL-1 receptor superfamily, as well as in response to the activation of some receptors of the TNF family (3–10). However, Cot/tpl2 does not participate in the activation of ERK1/2 by stimulation of the C-type lectin receptor dectin-1 (11).

In resting cells, Cot/tpl-2 forms a stable and inactive complex with p105 NF- $\kappa$ B and ABIN2 (A20-binding inhibitor of NF- $\kappa$ B2), among other proteins, to protect Cot/tpl-2 from degradation. Adequate TLR/IL-1 receptor stimulation induces the activation of the IKK complex; active IKK $\beta$  kinase phosphorylates p105 NF- $\kappa$ B, triggering its partial degradation to p50 NF- $\kappa$ B (12–15). Cot/tpl2 is then dissociated from the complex and with an adequate phosphorylation state (16–19) is capable of activating MKK1 and consequently ERK1/2 (6, 20–22) prior to being rapidly degraded through the proteasome pathway (6, 20, 23). Cot/tpl2 is required to process pre-TNF $\alpha$  to its mature secreted form in LPS-stimulated macrophages (24). In addition, in different isolated cell types Cot/tpl2 controls the secretion of other cytokines and chemokines such as IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , KC, and IL-6 (3, 10, 24–27). Moreover, Cot/tpl2 activation is necessary for the production of PGE<sub>2</sub> in LPS-stimulated macrophages (9). By studying Cot/tpl2-deficient mice, Cot/tpl2 has been demonstrated to participate in LPS-induced septic shock (7) and inflammatory bowel disease *in vivo* (28). Hence, Cot/tpl2 fulfills a role in innate and adaptive immunity that cannot be replaced by any other protein.

The MAP kinase ERK1/2 participates in many different biological processes. The precise biological role in which ERK1/2 is involved is given by the nature of the extracellular signal and consequently the MAP3K, such as Raf or Cot/tpl2 that triggers its activation. Cot/tpl2 provides an alternative, independent of other MKK1/2 kinases, mode of MKK1-ERK1/2 activation, thus providing a more specific target for pharmacological manipulation, without fully disturbing the ERK1/2 function. Thus, Cot/tpl2 has emerged as an attractive target to develop new and improved anti-inflammatory drugs (29, 30). Indeed, there is now enormous interest in the develop-

<sup>\*</sup> This work was supported by Comunidad de Madrid Grants SAF 2008-00819 and Mutua Madrileña.

[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. 1–5.

<sup>†</sup> Recipient of the Formación Personal Investigador fellowship.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed: Susana Alemany, IIBM CSIC-UAM, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain. Fax: 34 91 585 4401; E-mail: salemany@iibm.uam.es.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: TLR, Toll-like receptor; BMDM, bone marrow-derived macrophages; LTB<sub>4</sub>, leukotriene B<sub>4</sub>; MPO, myeloperoxidase; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MIP-1 $\beta$ , macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ ; KC, keratinocyte-derived chemokine.

ment of small compounds specifically to block Cot/tpl2 activity to identify new therapeutic anti-inflammatory agents (31–36).

Zymosan has been extensively used as an inducer of acute inflammation in mouse hindpaws. Here, we show that Cot/tpl2 mediates zymosan-induced inflammatory processes *in vivo*, and, as inflammation often results in the development of pain, Cot/tpl2 is involved in the maintenance of inflammatory hypernociception in mice. Furthermore, we also demonstrate that Cot/tpl2 modulates the number of neutrophils recruited to inflammatory foci induced by zymosan injection *in vivo* as well as the level of cytokines/chemokines, NGF, PGE<sub>2</sub>, and leukotriene (LT) B<sub>4</sub> production at those sites.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Animals and Models of Inflammation**—C57BL/6J WT and C57BL/6J Cot/tpl2<sup>−/−</sup> littermates were produced from heterozygotic mice, and their genotype was determined by PCR. Male WT and Cot/tpl2<sup>−/−</sup> mice 10–14 weeks old were used in the experiments. The zymosan-induced paw inflammation model was employed by injecting freshly prepared zymosan (300 μg, 30 μl of PBS; Invivogen) into the plantar region of the left hindpaw to induce inflammation; peritoneal inflammation was induced by injecting freshly prepared zymosan (1 mg, 500 μl of PBS) intraperitoneally. Intraplantar tissue samples were rinsed with saline and fixed by immersion in 4% formalin for 24 h before they were dehydrated in alcohol, clarified in xylene, and embedded in paraffin. Histological paraffin sections (5 μm) were stained with Masson's trichrome for analysis. Sections were studied with an Olympus Optical BX-50 microscope, using planapochromatic 100× lens for bright-field observation. Photomicrographs of selected fields were performed with an Olympus DP 70, 12-bit digital camera.

**Hindpaw Intraplantar Extracts and Intraplantar Cell Isolation**—Approximately 0.5 cm<sup>2</sup> of plantar tissue was harvested and frozen immediately in liquid nitrogen. The plantar tissue was homogenized in 1 ml of buffer (0.05% Tween 20, 10 mM EDTA (pH 7.5) in PBS) to measure NGF as well as different cytokines and chemokines. For RNA extraction, tissues were resuspended in 1 ml Trizol and for Western blot analysis in the lysis buffer described previously (37). The different samples were triturated in special tubes with matrix Lysing A (MP, Biomedicals) through three cycles of 6 s on ice in the Fastprep-24 apparatus (MP, Biomedicals). The different homogenized extracts were subjected to a centrifugation at 14,000 × g for 10 min at 4 °C, and supernatants were frozen at −80 °C until used. COX2 mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR analysis using specific COX2 TaqMan primers (Applied Biosystems). Cot/tpl2 protein expression was determined in homogenized intraplantar extracts as described previously (37). Intraplantar cells were isolated as described previously with some minor modifications (38, 39). Briefly, intraplantar tissue corresponding to six hindpaws was digested for 1 h at 37 °C in 800 μl of RPMI 1640 medium containing 10% FBS, 3 mg/ml collagenase (Sigma), and 1 mg/ml hyaluronidase (Sigma), with constant gentle rocking. The digested fragments were pressed through a 50-μm nylon filter (BD Biosciences) to remove particles. Isolated cells were washed twice in PBS and subjected to flow cytometry analysis using the antibodies described below

and according to a previously published method (40) with Tru-Count tubes (BD Biosciences). Control experiments showed that incubation of peritoneal cells with collagenase and hyaluronidase for 1 h at 37 °C did not alter the surface antigen phenotype of the cells (data not shown).

**Luminol-mediated Bioluminescence Imaging in Vivo and Measurement of Myeloperoxidase Activity in Intraplantar Extracts**—The bioluminescence generated after luminol intraperitoneal injection was measured in the whole animals as described previously (41). Briefly, after the intraplantar or intraperitoneal zymosan injection, luminol (5 mg/100 μl; Sigma) was intraperitoneally injected, and the bioluminescence was recorded in an IVIS lumina at the times indicated (Xenogen). To avoid the absorption of the bioluminescence by the black skin of the C57BL/6J mice, zymosan-induced peritonitis was performed in the C57 albinos [B6(Cg)-Tyr<sup>c-2j</sup>/J C57] WT and Cot/tpl2<sup>−/−</sup> mice. Myeloperoxidase (MPO) activity was measured as described previously (42) with some minor modifications. Briefly, intraplantar tissue was pulverized in liquid N<sub>2</sub> and then homogenized in PBS and subsequently snap-frozen in dry ice and thawed on three consecutive occasions. Debris were removed by a centrifugation at 2,000 × g for 20 min at 4 °C, and the supernatant was frozen at −20 °C. Measurement of MPO activity was performed in triplicate using 50 μl of intraplantar extracts or 50 μl of PBS with 0.5% HTAB, 150 μl of PBS, 15 μl of 0.22 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 μl 0.034% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and 20 μl of 18 mM TMB (Sigma) diluted in 8% dimethylformamide. After a 5-min incubation at 37 °C the reaction was terminated with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 μl, 0.18M), and absorbance measured (450 nm). Protein concentration was determined as described previously (37).

**Western Blotting of Bone Marrow-derived Macrophage Extracts**—Bone marrow derived macrophages (BMDM) were cultured as described previously (43), stimulated with zymosan (10 μg/ml), and at the times indicated, the cell supernatants were frozen in liquid nitrogen, and the cells (5 × 10<sup>6</sup>) were utilized to prepare extracts for analysis in Western blots (37) using anti-COX2 (Santa Cruz Biotechnology) and anti-ERK2 (Santa Cruz Biotechnology) antibodies.

**Flow Cytometry Analysis of Cytokines/Chemokines and of Isolated Cells**—Lavage of the peritoneal cavity was performed with 3 ml of PBS, and after a 30-s gentle manual massage, the peritoneal exudate containing fluid and leukocytes was retrieved. After centrifugation, the peritoneal fluid was used to evaluate the concentration of different chemokines and cytokines by FACS analysis. Cells obtained from the peritoneal lavages were washed twice in PBS, counted by two independent investigators blind to the source of the samples, and resuspended in 1 ml of PBS with 0.5% BSA. For phenotype analysis, peritoneal or intraplantar isolated cells (0.3–0.5 × 10<sup>6</sup> cells/test) were pre-treated with CD16/32 (2.4G2, Fc block; CultiGen) for 20 min in ice, and they were subsequently stained with antibodies raised against the following proteins at a concentration of 5 μg/ml: F4/80 (rat anti-mouse; eBioscience) for macrophage detection, Ly-6G (rat anti-mouse; Pharmingen) for neutrophil identification or their corresponding isotype controls (Pharmingen). The samples were analyzed by flow cytometry after multiple washing, and the data were examined using the CXP program. To



quantify simultaneously the concentration of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , KC, MCP-1, G-CSF, and GM-CSF in plantar tissue extracts, culture supernatants or in peritoneal exudates, CBA Cytometric (BD Biosciences) kits were utilized. Fluorescence intensities were assayed by flow cytometry in a FACS Canto Cytometer (BD Biosciences), and they were compared with a standard curve generated for each cytokine to determine the concentration in each sample. The data were analyzed utilizing the FCAP Array program (BD Biosciences).

**NGF, PGE<sub>2</sub>, and LTB<sub>4</sub> Measurement**—NGF levels were determined in mouse hindpaw extracts using the mouse NGF Sandwich ELISA kit (Millipore), according to the manufacturer's instructions. PGE<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> were measured in BMDM culture supernatants and in tissue plantar extracts using commercially available PGE<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> enzyme immunoassay kits (Cayman Chemicals). The analysis was performed by the company blind to the source of the samples.

**Measurement of Hindpaw Swelling and Evans Blue Extravasation**—The maximal dorso-plantar thickness and medio-lateral width measured proximal to the toes were determined at different times after zymosan (left hindpaw) or saline (right hindpaw) injection using a digital caliper (Starrett). This instrument has a resolution of 0.05 mm. Evans Blue plasma extravasation was studied as described previously (44). Briefly, Evans Blue (50 mg/kg) was injected intravenously into the lateral tail vein and immediately afterward, zymosan was intraplantar-injected into the left hindpaw and PBS into the right hindpaw. After 4 h, the intraplantar tissue was removed, chopped up, and incubated in formamide for 24 h at 56 °C. The Evans Blue extracted was measured spectrophotometrically at 600 nm.

**Behavioral Procedures**—Behavioral tests were performed in a low lit and quiet room, always by the same researcher who was blind to the treatment. On the day of the behavioral experiments, the animals were habituated to the apparatus for at least 30 min before beginning the behavioral testing. The animals were placed in Plexiglas chambers (12 × 8 × 16 cm) with a wire mesh floor, and the plantar surface of the hindpaw was stimulated using a hand-held force transducer (electronic anesthesiometer, IITC Life Science) with a semiflexible polypropylene probe tip (0.5-mm<sup>2</sup> diameter). The probe was applied perpendicular to the central area of the paw, gradually increasing the force until the animal withdrew its foot with a clear flinching action. The left and right hindpaws were stimulated alternatively three times, at intervals of at least 1 min, and the average score of the three readings was taken as the threshold value for paw withdrawal. All mice were tested before any inflammatory procedure to establish a baseline level of responsiveness. In the zymosan experiment, the baseline withdrawal threshold was 6.9 ± 0.2 g ( $n = 16$ ). The results are presented as the difference in withdrawal thresholds (in grams) before ( $t = 0$ ) and after injection of the inflammatory agents. The behavioral analysis was performed 3, 6, 24, and 48 h after zymosan injection.

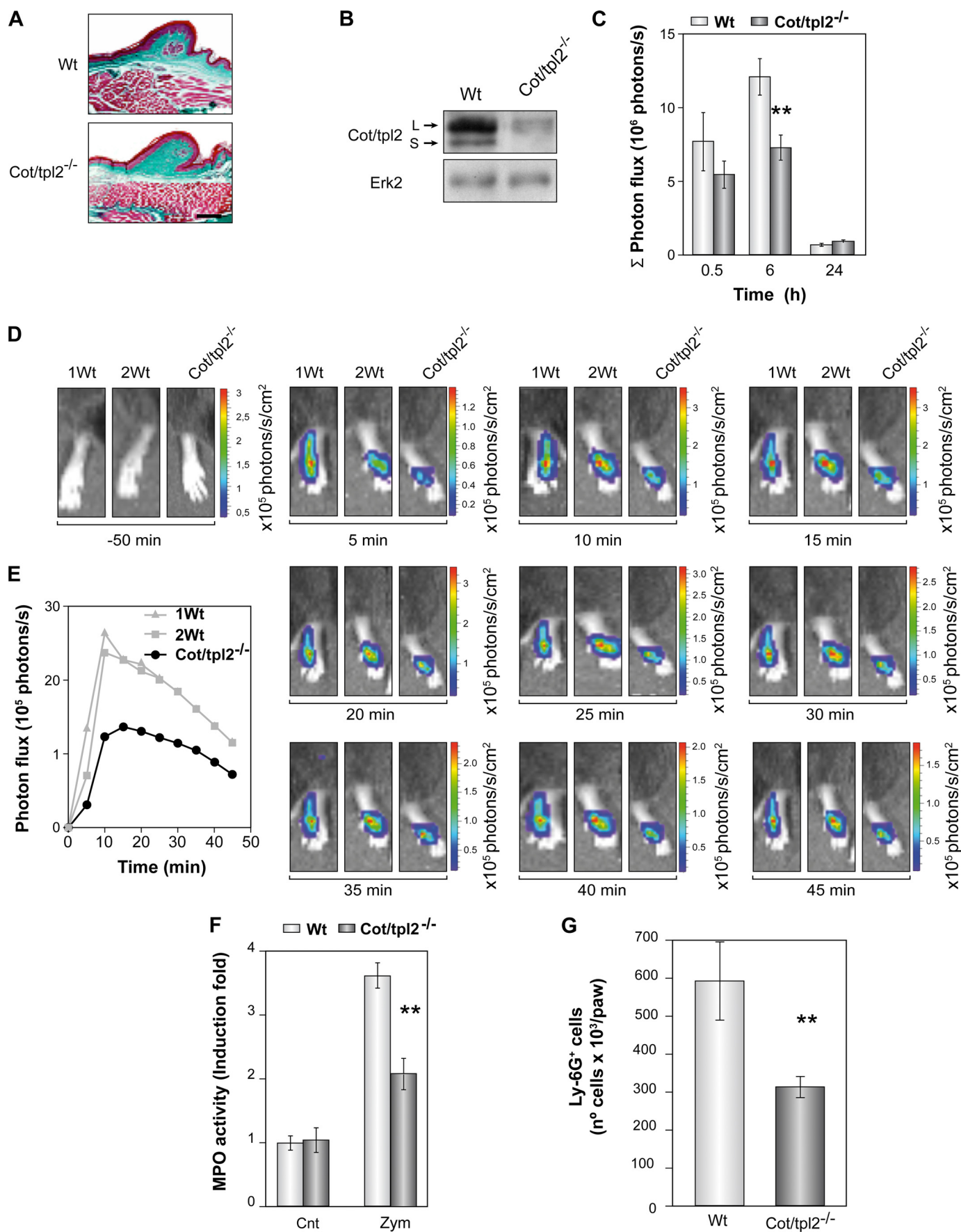
**Statistical Analysis**—The results are presented as the means ± S.E. The behavioral outcomes were compared by means of a two-way ANOVA with a Tukey post hoc test, and the rest of the data were analyzed with Student's  $t$  test. Values were taken to be statistically significant at  $p < 0.05$  (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

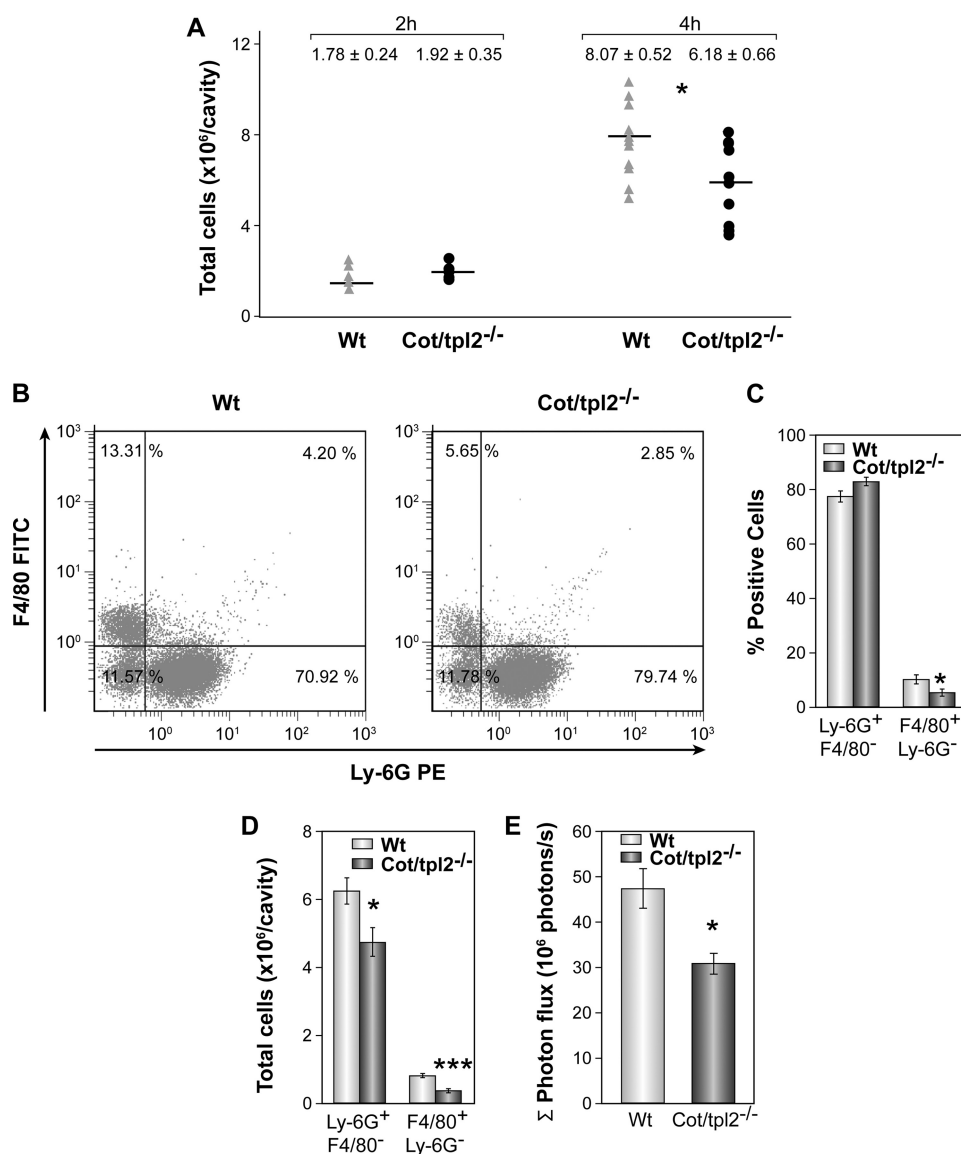
## RESULTS

**Cot/tpl2 Modulates Zymosan-induced MPO Activity in Mice Hindpaws**—Zymosan stimulates both dectin-1 and TLR2/6 receptors. Thus, to ensure a role of Cot/tpl2 in the zymosan intracellular signaling through TLR2/6, we stimulated WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> BMDM, which express low levels of dectin-1 but high levels of TLR2/6 (45), with zymosan and found no increase in the phosphorylation state of ERK1/2 in Cot/tpl2<sup>-/-</sup> BMDM (supplemental Fig. S1). Moreover, we ensured that Cot deficiency does not modify the normal stratified skin epithelium or epidermal-dermal organization in the hindpaws of the mice (Fig. 1, A and B).

MPO is one of the principal components of the azurophilic granules in neutrophils, and as such, it has been extensively used as a marker of neutrophil infiltration and acute inflammation (46, 47). Luminol-mediated bioluminescence *in vivo* has been recently reported to determine the MPO activity at the inflamed site (41), thus the amount of bioluminescence produced after the luminol intraperitoneal injection was determined *in vivo* 0.5, 6, and 24 h following the injection with zymosan in the plantar region of the WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice left hindpaw. There was a significant decrease in the bioluminescence generated in Cot/tpl2<sup>-/-</sup> hindpaws 6 h after the injection of zymosan (Fig. 1, C–E). The bioluminescence observed 24 h later in both WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> hindpaws had returned to almost basal levels (Fig. 1C). In concordance with these data, Cot/tpl2<sup>-/-</sup> hindpaw extracts 6 h following zymosan injection showed a 47% decreased MPO specific activity compared with zymosan-injected WT hindpaws extracts (Fig. 1F). Because this decrease in MPO activity in Cot/tpl2<sup>-/-</sup> hindpaws could indicate a decrease in the number of infiltrated neutrophils, the number of inflammatory cells was determined in zymosan-injected WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> hindpaws. To this end, WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> intraplantar tissues 6 h following intraplantar injection of zymosan were subjected to collagenase and hyaluronidase digestion, and isolated cells were subsequently subjected to flow cytometry analysis (supplemental Fig. S2). Cot/tpl2<sup>-/-</sup> inflamed intraplantar tissue showed 46% less neutrophils (Ly-6G<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup>) than their WT counterpart (Fig. 1G), whereas no neutrophils could be detected in control WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> hindpaws (data not shown).

**Altered Inflammatory Cell Recruitment after Intraperitoneal Zymosan Injection in Cot/tpl2<sup>-/-</sup> Mice**—To establish further the role of Cot/tpl2 in the recruitment of inflammatory cells, the number of cells recruited in response to zymosan-induced peritonitis was evaluated in WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice. A similar number of cells were observed in the peritoneum of WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice 2 h after the initiation of inflammation (Fig. 2A), and even though after 4 h the number of cells recruited to the peritoneal cavity increased, Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice showed 25% less cell recruitment. Flow cytometry analysis of these cells demonstrated a significant decrease in the proportion of macrophages (F4/80<sup>+</sup>Ly-6G<sup>-</sup>) in Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice, whereas the percentage of neutrophils (Ly-6G<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup>) was similar in both groups (Fig. 2, B and C). Nevertheless, when the reduction in the total number of cells recruited from the peritoneum of Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice was taken into account, Cot/





**FIGURE 2. Recruitment of inflammatory cells during zymosan-induced peritonitis in WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice.** Animals were injected intraperitoneally with zymosan (1 mg, 500  $\mu$ l of PBS), killed 2 or 4 h later, and the peritoneal cells were obtained. **A**, total number of cells recruited at 2 and 4 h after zymosan-induced peritonitis in WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice (2 h,  $n = 5$  each group; 4 h,  $n = 9$  each group). **B**, representative FACS profile of F4/80<sup>+</sup>Ly-6G<sup>-</sup> versus Ly-6G<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> staining of total isolated intraplantar cells obtained 6 h after the zymosan injection (left panel, WT; right panel, Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice). Data are representative of six independent WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> animals. **C**, means  $\pm$  S.E. (error bars) of the Ly-6G<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> (neutrophils) and F4/80<sup>+</sup>Ly-6G<sup>-</sup> (macrophages) cells recruited at 4 h from the peritoneum of WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice ( $n = 6$  for each group). **D**, total number of Ly-6G<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> and F4/80<sup>+</sup>Ly-6G<sup>-</sup> cells calculated using the formula: % positive cells  $\times$  0.01  $\times$  total cell number obtained in **A**. The graph shows the means  $\pm$  S.E. of six animals/group.

tpl2 deficiency not only provoked a decrease of approximately 65% in the number of macrophages recruited but also, a decrease of approximately 25% in the total number of neutrophils recruited (Fig. 2D). Accordingly, Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice

showed approximately 30% less luminol-mediated bioluminescence *in vivo* 4 h after the intraperitoneal injection of zymosan (Fig. 2E and supplemental Fig. S3). Recent evidences point to MPO to control the inflammation by activating the neutrophils through its association with integrin CD11b/CD18, with MPO emerging as a mayor player controlling inflammation (48–51). Nevertheless, it should be noted that no significant differences were observed in the expression of CD11b in WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> macrophages or neutrophils (supplemental Fig. S4).

**Modulation of Chemokine and Cytokine Production by Cot/tpl2 Deficiency in Vivo**—The release of the chemokines MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, and KC at the acute inflammatory focus is responsible for the recruitment of inflammatory cells (52, 53). Thus, we analyzed the role of Cot/tpl2 in the secretion of these chemokines induced by zymosan in the intraplantar tissue. MIP-1 $\beta$  concentration decreased significantly within the first 2 h of zymosan injection in the intraplantar tissue of Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3). By contrast, both WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> hindpaws had similar levels of MIP-1 $\alpha$  during the progression of inflammation (Fig. 3). A significant decrease in MCP-1 levels was observed 5 h after zymosan injection in the hindpaws of Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice compared with zymosan-injected WT hindpaws, whereas in zymosan-injected Cot/tpl2<sup>-/-</sup> intraplantar tissue KC levels were reduced by 25% with respect to the WT intraplantar tissue 2 h after the initiation of inflammation (Fig. 3).

Taking into account the established role of GM-CSF and G-CSF in recruiting and also maintaining macrophages and neutrophils active at the inflammatory site (54–56), we also

**FIGURE 1. MPO activity in the hindpaws of zymosan-injected WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice.** **A**, sections of naive hindpaws from WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice stained with Masson's trichrome. Scale bar, 100  $\mu$ m. **B**, Western blots of naive intraplantar lysates from WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice. **C**, means  $\pm$  S.E. (error bars) of the  $\Sigma$  of the photon flux generated by the intraperitoneal injection of luminol at different times after zymosan injection (0.5, 6, and 24 h) in the hindpaws of WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice ( $n = 8$  for each type of mice). **D**, luminol-mediated bioluminescence images of the hindpaws from WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice 6 h after the intraplantar zymosan injection. The images have been taken before and between 5 and 45 min after intraperitoneal injection of luminol at 5-min intervals (one representative experiment with one Cot/tpl2<sup>-/-</sup> and two from WT mice is shown). **E**, representation of the photon influx recorded in **D**. **F**, measurement of MPO activity in the intraplantar tissue extracts of WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice hindpaws 6 h following zymosan (Zym) or just PBS (Cnt) injection. The value 1 is given to O.D./mg protein of WT intraplantar extracts injected only with PBS. The means  $\pm$  S.E. of three independent experiments of four different pooled tissue extracts from each condition are shown. **G**, total number of Ly-6G<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> isolated from WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> intraplantar tissue 6 h following zymosan injection. The means  $\pm$  S.E. of four independent experiments of six different pooled digested intraplantar tissues are shown.



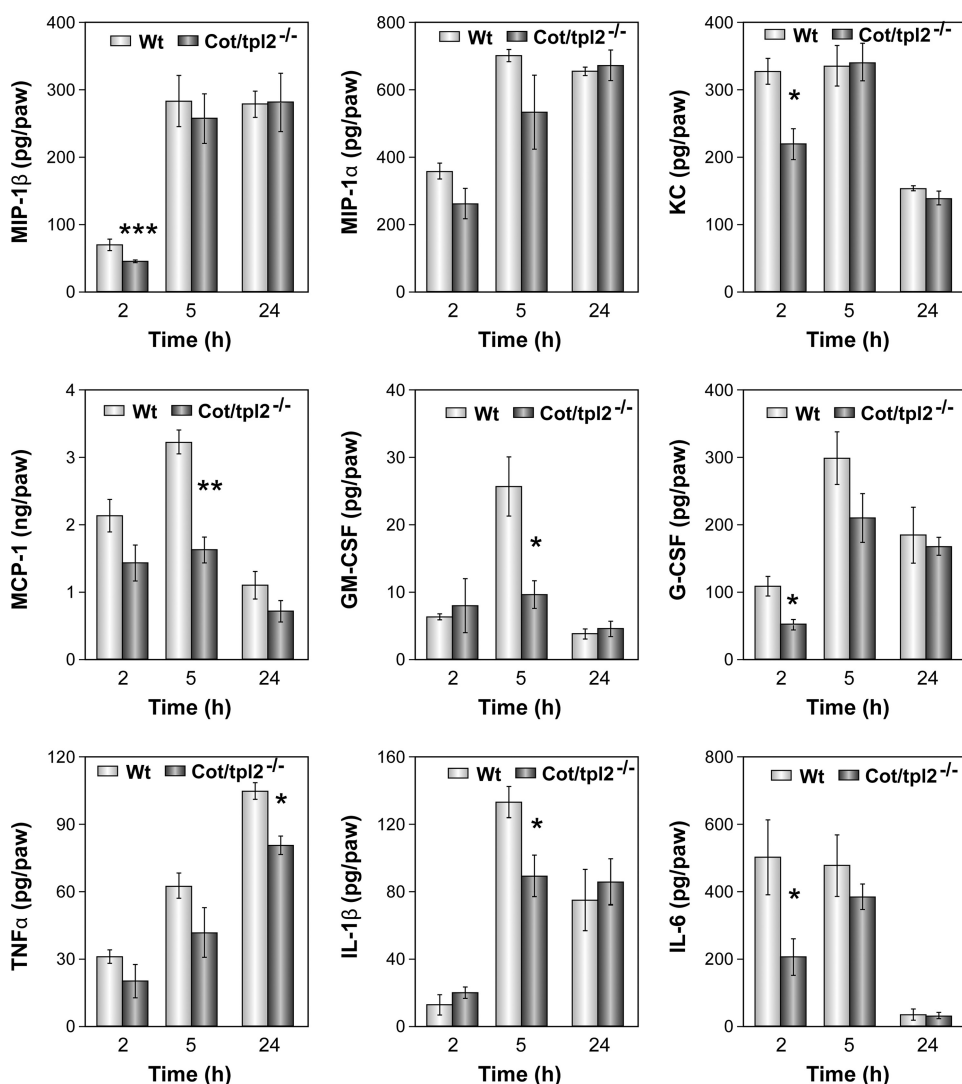


FIGURE 3. Zymosan induction of cytokines and chemokines in intraplantar tissues of WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice. The concentration of MIP-1β, MIP-1α, KC, MCP-1, GM-CSF, G-CSF, TNFα, IL-1β, and IL-6 in the intraplantar tissue extracts of WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice was determined 2, 5, and 24 h after the injection of zymosan by FACS analysis with the CBA system. The means ± S.E. (error bars) of three independent experiments of three different pooled tissues extracts from each condition are shown.

studied the possible role of Cot/tpl2 in modulating the levels of these mediators at the inflammatory site. In the hindpaws of WT mice, maximal levels of GM-CSF were detected 5 h after zymosan injection, and at this time, the GM-CSF levels in Cot/tpl2<sup>-/-</sup> were decreased significantly. Similarly, a decrease in G-CSF in the hindpaws of Cot/tpl2-deficient mice was detected 2 h after zymosan injection.

TNFα, IL-1β, and IL-6 are the main proinflammatory cytokines that activate the nociceptive terminals that innervate the inflamed tissues (52, 53, 57). Thus, we also decided to evaluate their levels during the course of zymosan-induced hindpaw inflammation. In zymosan-injected hindpaws of Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice there was a tendency to produce lower TNFα, with a significant reduction of approximately 20% 24 h following zymosan injection compared with WT littermates (Fig. 3). A significant 30% decrease in IL-1β in zymosan-injected hindpaws of Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice was evident at 5 h. Furthermore, Cot/tpl2 deficiency also provoked lower levels of IL-6 within the first 2 h after intraplantar zymosan-induced inflammation (Fig. 3).

NGF, PGE<sub>2</sub>, and LTB<sub>4</sub> Production in Zymosan-injected Intraplantar Tissue of WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> Mice—NGF and PGE<sub>2</sub> are key participants in the pain sensitization at the inflamed site (52, 53, 58). The rapid increase of NGF at the inflammatory site is dependent on, among other signals, the concentration of IL-1β and TNFα (58–60). The quantification of NGF levels during the progression of inflammation in zymosan-injected WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> hindpaws showed that Cot/tpl2 is a master regulator of the production of this pronociceptive factor (Fig. 4A).

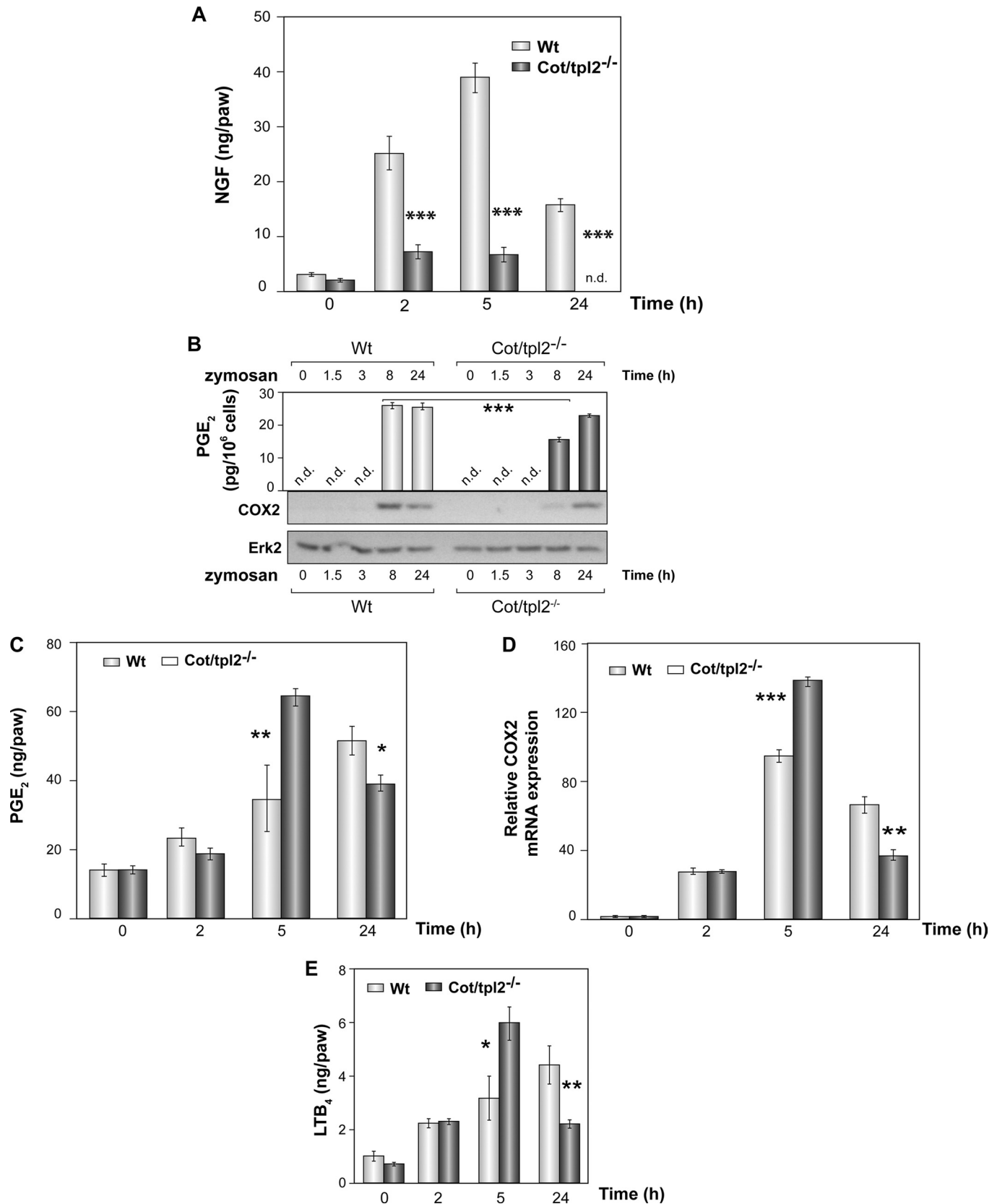
On the basis of Cot/tpl2 capacity to trigger PGE<sub>2</sub> as well as TNFα production in LPS-stimulated BMDM, Cot/tpl2 has been proposed as a new interesting anti-inflammatory target (29, 30). Indeed, COX2 expression is impaired in Cot/tpl2-deficient BMDM within the first 10 h of LPS stimulation (9). Likewise, COX2 protein and PGE<sub>2</sub> production were also impaired in zymosan-stimulated Cot/tpl2<sup>-/-</sup> macrophages 8 h after zymosan stimulation. However, after 24 h only a minor decrease in PGE<sub>2</sub> levels was evident in Cot/tpl2<sup>-/-</sup> BMDM, and there were no significant differences in the levels of COX2 in Cot/tpl2<sup>-/-</sup> compared with WT littermates (Fig. 4B). More importantly, the levels of PGE<sub>2</sub> in the extracts of zymosan-injected intraplantar tis-

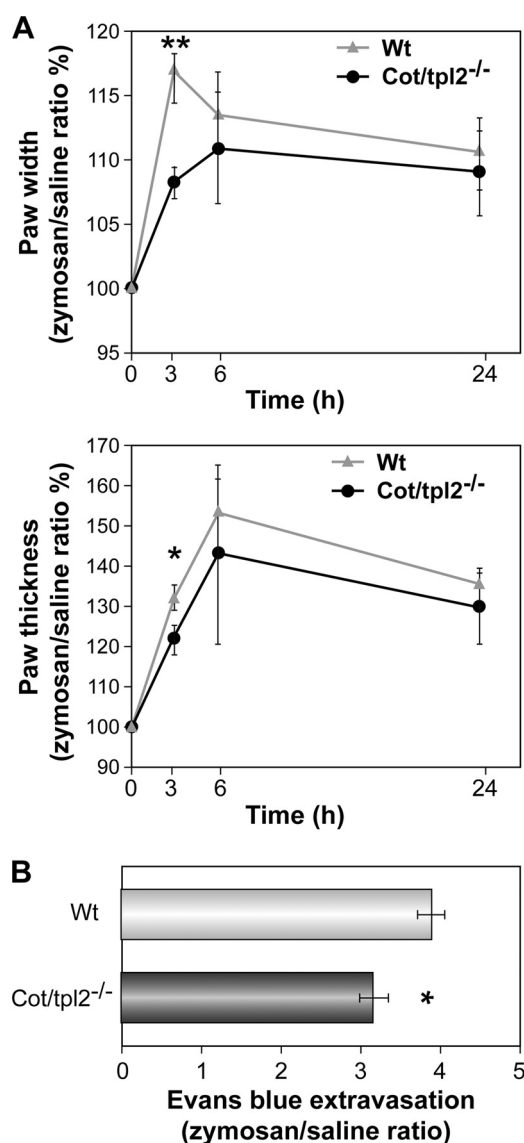
ues from both WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice unexpectedly showed that Cot deficiency increased the concentration of PGE<sub>2</sub> 2-fold 5 h after the intraplantar injection of zymosan; however, 24 h following zymosan injection a 25% decrease was observed (Fig. 4C). These data correlated with the levels of COX2 mRNA detected in the zymosan-injected intraplantar tissue of Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4D). LTB<sub>4</sub> is involved in the expression of PGE<sub>2</sub> in zymosan-induced joint hypernociception (61), and thus, LTB<sub>4</sub> was measured at different times after zymosan injection in WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> hindpaws. Cot/tpl2 deficiency was associated with an increase in LTB<sub>4</sub> levels at 5 h, although there was a significant decrease 24 h later (Fig. 4E). LTB<sub>4</sub> could not be detected in either zymosan-activated WT or Cot/tpl2<sup>-/-</sup> BMDM at any of the different times (0, 1.5, 3, 8, and 24 h) tested (data not shown).

Induction of Edema Formation in Zymosan-injected Hindpaws of WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> Mice—The formation of edema is a sign of inflammation, and there was a significantly smaller increase in both medio-lateral width and dorso-

plantar thickness in the zymosan-injected hindpaws of *Cot/tpl2<sup>-/-</sup>* mice than in WT 3 h after intraplantar zymosan injection (Fig. 5, *A* and *B*). Accordingly, plasma extravasation

as measured by Evans Blue outflow revealed significantly less extravasation in the paws of *Cot/tpl2<sup>-/-</sup>* mice 4 h after the intraplantar injection of zymosan (Fig. 5*C*). Nevertheless,





**FIGURE 5. Paw edema following the induction of inflammation by zymosan in hindpaws of WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice.** A, width and thickness of zymosan (left) and PBS (right) injected hindpaws from WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice before and at different times after injection. The values of hindpaw width and thickness are expressed as the value between the diameter measured after induction of inflammation divided by the basal (before) diameter in millimeters. Data are shown as the means  $\pm$  S.E. ( $n = 7$ ), the value obtained before the injection being considered as 100%. B, quantification of Evans Blue extravasation over 4 h in zymosan-injected hindpaws from WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice. Values of Evans Blue extravasation are expressed as the values between the inflamed plantar tissue and its corresponding control. The graph represents means  $\pm$  S.E. (error bars) ( $n = 9$  for each condition).

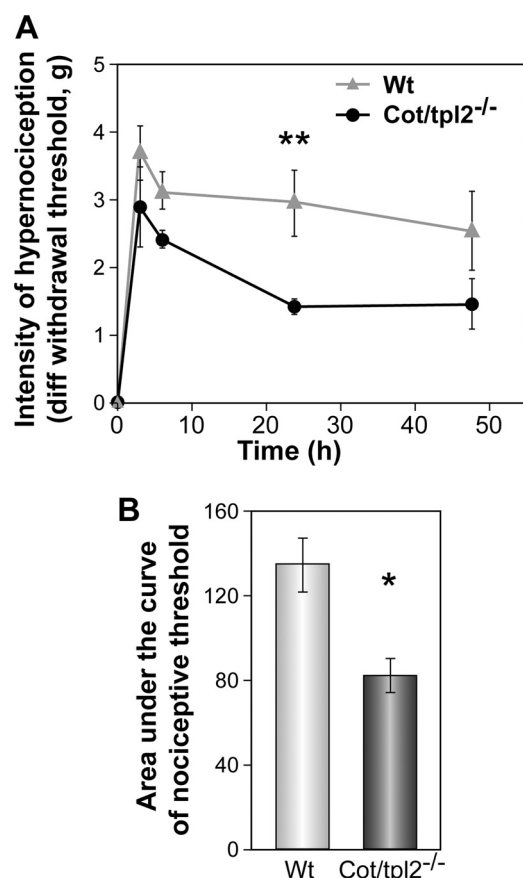
similar levels of swelling were observed between the hindpaws of WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice 6 h and 24 h after the induction of inflammation.

**Cot/tpl2 Is Involved in Inflammatory Hypernociception in Mice**—Finally, we evaluated how the aforementioned modulation of cytokine/chemokine, NGF, and PGE<sub>2</sub> production at the inflammatory site observed *in vivo* as a consequence of the deficiency of Cot/tpl2, affects the whole process of acute inflammation. Inflammatory pain is characterized by hypernociception whereby the intensity of the sensitization to a painful stimulus is preceded by and is directly dependent on the recruitment of inflammatory cells and the release of inflammatory cytokines and pronociceptive ligands (52, 53, 57). Thus, to evaluate the importance of Cot/tpl2 in inflammation *in vivo*, we quantified inflammatory hypernociception in the hindpaws of WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice intraplantar-injected with zymosan. Overall, there was a time-dependent reduction in mechanical hypernociception in Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice compared with WT over a 48-h time course, with the most striking differences evident at 24 h after injection (Fig. 6). Furthermore, to evaluate the role of Cot/tpl2 in peripheral acute inflammation with a ligand that activates a TLR (TLR4), but not other pattern recognition receptors such as dectin-1, we also studied the role of Cot/tpl2 inflammatory hypernociception by injecting LPS into the hindpaws of the WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice, detecting again a significant decrease in LPS-induced hypernociception in Cot/tpl2-deficient mice (supplemental Fig. S5, A and B).

## DISCUSSION

Cot/tpl2 controls ERK1/2 activation by TLR ligands, IL-1, and TNF $\alpha$  (3–8, 10, 62), and its inhibition does not affect the activation of the ERK1/2 pathway by other MAP3Ks. On the basis of its capacity to trigger PGE<sub>2</sub> and TNF $\alpha$  production, Cot/tpl2 has emerged as an attractive target to develop new and improved anti-inflammatory drugs (for review, see Refs. 29, 30). In this article we have studied the role of Cot/tpl2 in peripheral inflammation *in vivo*, demonstrating a role of Cot/tpl2 in inflammatory hypernociception and providing evidence of deficient neutrophil recruitment. MPO, one of the principal components of the azurophilic granules in neutrophils, has also emerged as a major factor controlling the acute inflammatory process (48–51), and our data demonstrate that Cot/tpl2-deficient mice show decreased luminol-mediated bioluminescence determined *in vivo* in two different zymosan-induced inflammation models and decreased MPO activity measured *in vitro* in intraplantar extracts of Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice hindpaws injected with zymosan. This loss of MPO activity is in accordance with the lower number of recruited neutrophils at the inflamed site in Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice. The impaired recruitment of cells induced by Cot/tpl2 deficiency is consistent with the decreased levels of different chemotactic factors (53–56, 63, 64) such as MIP-1 $\beta$ ,

**FIGURE 4. Involvement of Cot/tpl2 in the production of NGF, PGE<sub>2</sub>, and LTB<sub>4</sub> synthesis by zymosan.** A, concentration of NGF in the intraplantar tissue extracts of WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice hindpaws determined by ELISA 0, 2, 5, and 24 h after the injection of zymosan. The means  $\pm$  S.E. (error bars) of three independent experiments of three different pooled tissues extracts from each condition are shown. B, Western blot showing COX2 expression in WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> BMDM stimulated with zymosan (10  $\mu$ g/ml). As control of total protein, loaded total ERK2 levels were tested. One representative experiment of the four performed is shown. The PGE<sub>2</sub> concentration was measured in the supernatant of BMDM cells stimulated for 8 and 24 h. The means  $\pm$  S.E. of two independent determinations of three different pooled supernatants from each condition are shown. C, PGE<sub>2</sub> concentration in intraplantar tissues of WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice 0, 2, 5, and 24 h after injection with zymosan (300  $\mu$ g, 30  $\mu$ l). D, expression of COX2 mRNA detected by quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from zymosan-injected intraplantar tissues. The means  $\pm$  S.E. of two independent determinations of four different pooled tissue extracts from each condition are shown. E, LTB<sub>4</sub> concentration in the samples determined in C. C and E, means  $\pm$  S.E. of two independent measurements of four different pooled tissue extracts from each condition.



**FIGURE 6. Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice develop less hyperalgesia than the WT.** Mechanical hypernociception was assessed following zymosan injection (300  $\mu$ g, 30  $\mu$ l) over a period of 48 h in WT ( $n = 8$ ) and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice ( $n = 7$ ). **A**, time-response curve of zymosan-induced hypernociception in WT and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice. The results are presented as the means  $\pm$  S.E. (error bars). \*\*,  $p = 0.004$ , two-way ANOVA, Tukey post hoc. **B**, area under the curve graph. The changes in nociceptive threshold and withdrawal latency were calculated for each mouse as the area under the curve *versus* time (over a 48-h period), and the results are presented as the means  $\pm$  S.E. \*,  $p = 0.019$ , Student's  $t$  test.

KC, G-CSF, and/or GM-CSF detected within the first 5 h of inflammation in Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice.

Cot/tpl2 has an established essential role in the secretion of MCP-1, MIP-1 $\beta$ , KC, and IL-6 in several isolated cell types mainly following LPS stimulation but also, when stimulated with IL-1 (3, 10, 24–27). However, our data here indicate that the contribution of Cot/tpl2 to the expression of a specific cytokine or chemokine *in vivo* is not as straightforward as detected in single isolated cell types. It is important to note that Cot/tpl2<sup>-/-</sup> BMDM stimulated with zymosan show similar KC and MCP-1 secretion levels as reported previously for LPS-stimulated BMDM (data not shown). Indeed, and as expected in a dynamic process, our data indicate that the role of Cot/tpl2 on the production of certain inflammatory mediators varies during the inflammatory response. This hypothesis is reinforced by the fact that in the modulation of the hypernociceptive response the main striking difference is observed at 24 h, but differences in paw swelling by Cot/tpl2 deficiency are only observed at 3 h following the zymosan-induced inflammation response. Nevertheless, here we demonstrate that the expression levels of GM-CSF and G-CSF, with an active role in recruiting and maintain-

ing active macrophages and neutrophils at the inflammatory focus (54–56), are modulated by Cot/tpl2.

Cot/tpl2 has been proposed to be essential for the TNF $\alpha$  secretion in response to LPS stimulation. The prior intravenously administration of a Cot/tpl2 inhibitor in rats reduced TNF $\alpha$  plasma levels by 85% at 90 min following LPS administration (35). Besides, Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice hardly produce any TNF $\alpha$  within the first 30 and 60 min after intraperitoneal injection of LPS/D-galactosamine (7). Furthermore, Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice show a 50% decrease in TNF $\alpha$  levels in the peritoneum after 2 or 3 h of zymosan intraperitoneal injection (data not shown) (11). In contrast, in zymosan-induced intraplantar inflammation, Cot/tpl2 hardly regulates TNF $\alpha$  production within the first 5 h following zymosan injection, but a significant TNF $\alpha$  decrease by Cot/tpl2 deficiency is observed 24 h after the induction of inflammation.

Cot/tpl2 controls the production of PGE<sub>2</sub> in LPS-stimulated Cot/tpl2-deficient BMDM (62) as well as in IL-1 stimulated rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes (27). The expression of COX2 is impaired in zymosan-stimulated Cot/tpl2-deficient BMDM within the first 8 h of stimulation, as is PGE<sub>2</sub> production, although these data do not correlate with that observed *in vivo*. In this context, it is again clear that the tissue microenvironment is more complex than isolated cell systems. LTB<sub>4</sub> plays an important role in inflammatory hypernociception. It has been shown to mediate the secretion of PGE<sub>2</sub> in zymosan-induced inflammation *in vivo* (61), and zymosan induces LTB<sub>4</sub> in mast cells (65). Thus, considering the correlation between the levels of PGE<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> during the course of hindpaw inflammation, it remains possible that PGE<sub>2</sub> levels that are increased in 5-h zymosan-injected Cot/tpl2<sup>-/-</sup> hindpaws but decreased 24 h after zymosan injection are LTB<sub>4</sub>-mediated.

Inflammatory hypernociception is directly dependent on the production of nociceptive mediators generated at the inflamed site (53, 66, 67). PGE<sub>2</sub>, TNF $\alpha$ , NGF, IL-1 $\beta$ , and IL-6 provoke the activation of nociceptive terminals that innervate the inflamed tissues (52, 53, 58). Our data show that Cot/tpl2 controls the production of NGF during the course of the zymosan-induced inflammation. Decreased levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 within the first 5 h after the intraplantar injection of zymosan in Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice were also observed. At this time point, however, the Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice reflected a reduction of only approximately 15% in the hypernociceptive behavior compared with WT littermates. In this context, it should be noted that at this time increased levels of PGE<sub>2</sub> in Cot/tpl2<sup>-/-</sup> zymosan-injected hindpaws were detected. Nevertheless, 24 h following intraplantar injection of zymosan, Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice showed a 50% reduction in the hypernociceptive behavior, together with reduced levels of NGF, TNF $\alpha$ , and PGE<sub>2</sub>.

In conclusion, our data show that Cot/tpl2 regulates NGF and LTB<sub>4</sub> production, the levels of GM-CSF and G-CSF, and MPO activity along inflammatory response affecting the zymosan-induced acute inflammatory process and the resulting hypernociception.

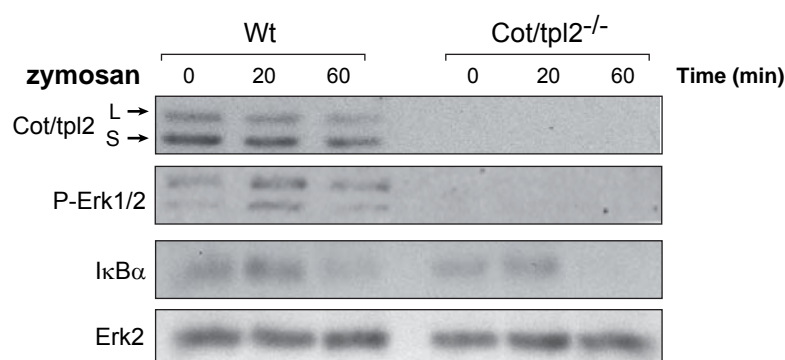
**Acknowledgments**—We thank R. Encinar, C. Sánchez-Palomo, and M<sup>a</sup>C. Moreno for the technical work, Carlos Avendaño for conceptual advice, and Eduardo Malmierca for the critical reading of the manuscript.



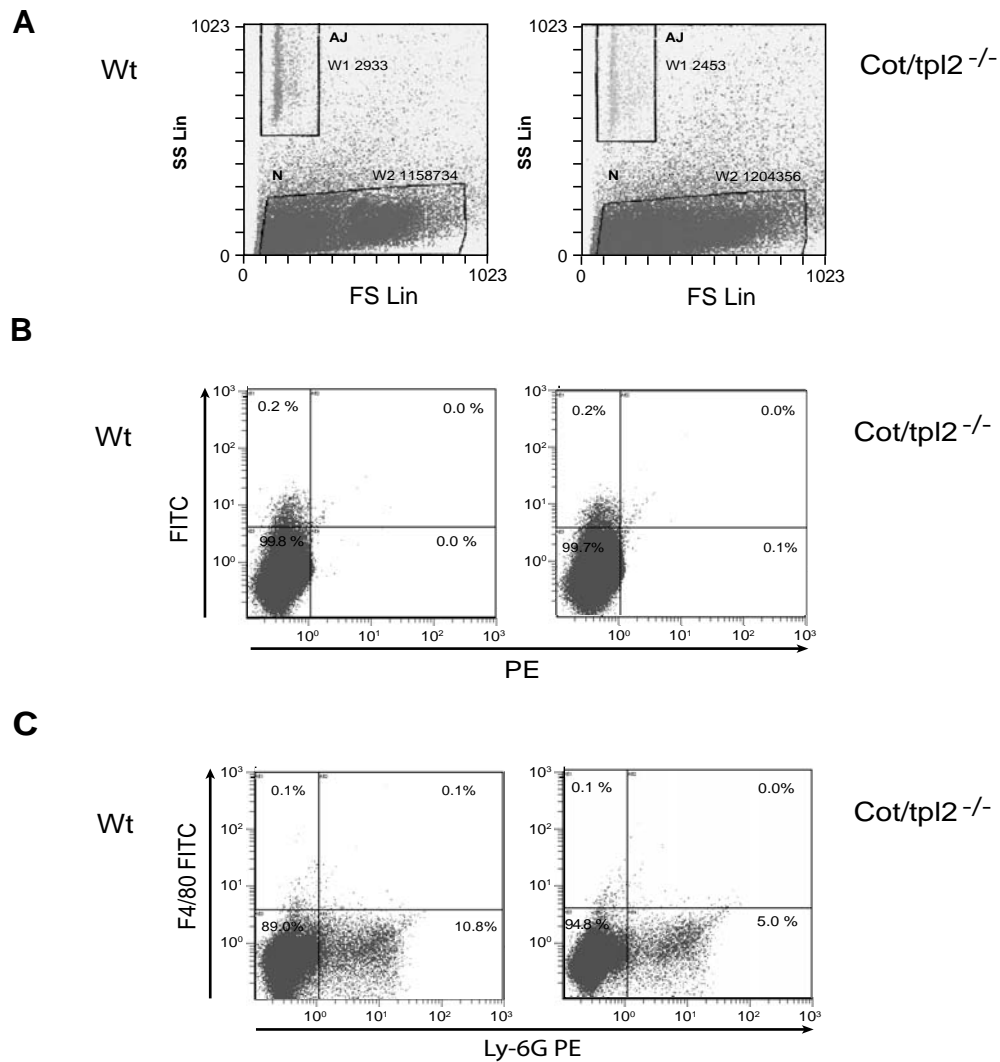
## REFERENCES

- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010) *Cell* **140**, 805–820
- Akira, S., and Takeda, K. (2004) *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511
- Banerjee, A., Gugasyan, R., McMahon, M., and Gerondakis, S. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 3274–3279
- Banerjee, A., and Gerondakis, S. (2007) *Immunol. Cell Biol.* **85**, 420–424
- Loniewski, K. J., Patial, S., and Parameswaran, N. (2007) *Mol. Immunol.* **44**, 3715–3723
- Waterfield, M. R., Zhang, M., Norman, L. P., and Sun, S. C. (2003) *Mol. Cell* **11**, 685–694
- Dumitru, C. D., Ceci, J. D., Tsatsanis, C., Kontoyiannis, D., Stamatakis, K., Lin, J. H., Patriotis, C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Kollias, G., and Tschlis, P. N. (2000) *Cell* **103**, 1071–1083
- Caivano, M., Rodriguez, C., Cohen, P., and Alemany, S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 52124–52130
- Eliopoulos, A. G., Dumitru, C. D., Wang, C. C., Cho, J., and Tschlis, P. N. (2002) *EMBO J.* **21**, 4831–4840
- Rodríguez, C., Pozo, M., Nieto, E., Fernández, M., and Alemany, S. (2006) *Cell. Signal.* **18**, 1376–1385
- Mielke, L. A., Elkins, K. L., Wei, L., Starr, R., Tschlis, P. N., O'Shea, J. J., and Watford, W. T. (2009) *J. Immunol.* **183**, 7984–7993
- Salmerón, A., Janzen, J., Soneji, Y., Bump, N., Kamens, J., Allen, H., and Ley, S. C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 22215–22222
- Heissmeyer, V., Krappmann, D., Wulczyn, F. G., and Scheidereit, C. (1999) *EMBO J.* **18**, 4766–4778
- Orian, A., Gonen, H., Bercovich, B., Fajerman, I., Eytan, E., Israël, A., Mercurio, F., Iwai, K., Schwartz, A. L., and Ciechanover, A. (2000) *EMBO J.* **19**, 2580–2591
- Vallabhapurapu, S., and Karin, M. (2009) *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 693–733
- Stafford, M. J., Morrice, N. A., Pegg, M. W., and Cohen, P. (2006) *FEBS Lett.* **580**, 4010–4014
- Cho, J., and Tschlis, P. N. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 2350–2355
- Robinson, M. J., Beinke, S., Kouroumalis, A., Tschlis, P. N., and Ley, S. C. (2007) *Mol. Cell Biol.* **27**, 7355–7364
- Handoyo, H., Stafford, M. J., McManus, E., Baltzis, D., Pegg, M., and Cohen, P. (2009) *Biochem. J.* **424**, 109–118
- Waterfield, M., Jin, W., Reiley, W., Zhang, M., and Sun, S. C. (2004) *Mol. Cell Biol.* **24**, 6040–6048
- Beinke, S., Deka, J., Lang, V., Belich, M. P., Walker, P. A., Howell, S., Smerdon, S. J., Gamblin, S. J., and Ley, S. C. (2003) *Mol. Cell Biol.* **23**, 4739–4752
- Beinke, S., and Ley, S. C. (2004) *Biochem. J.* **382**, 393–409
- Gándara, M. L., López, P., Hernando, R., Castaño, J. G., and Alemany, S. (2003) *Mol. Cell Biol.* **23**, 7377–7390
- Rousseau, S., Papoutopoulou, M., Symons, A., Cook, D., Lucocq, J. M., Prescott, A. R., O'Garra, A., Ley, S. C., and Cohen, P. (2008) *J. Cell Sci.* **121**, 149–154
- Yang, H. T., Cohen, P., and Rousseau, S. (2008) *Cell. Signal.* **20**, 375–380
- Van Acker, G. J., Perides, G., Weiss, E. R., Das, S., Tschlis, P. N., and Steer, M. L. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 22140–22149
- Hall, J. P., Kurdi, Y., Hsu, S., Cuozzo, J., Liu, J., Telliez, J. B., Seidl, K. J., Winkler, A., Hu, Y., Green, N., Askew, G. R., Tam, S., Clark, J. D., and Lin, L. L. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 33295–33304
- Kontoyiannis, D., Boulougouris, G., Manoloukos, M., Armaka, M., Apostolaki, M., Pizarro, T., Kotlyarov, A., Forster, I., Flavell, R., Gaestel, M., Tschlis, P., Cominelli, F., and Kollias, G. (2002) *J. Exp. Med.* **196**, 1563–1574
- Cohen, P. (2009) *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 317–324
- Gaestel, M., Kotlyarov, A., and Kracht, M. (2009) *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 480–499
- Kaila, N., Green, N., Li, H. Q., Hu, Y., Janz, K., Gavrin, L. K., Thomason, J., Tam, S., Powell, D., Cuozzo, J., Hall, J. P., Telliez, J. B., Hsu, S., Nickerson-Nutter, C., Wang, Q., and Lin, L. L. (2007) *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 6425–6442
- Cusack, K., Allen, H., Bischoff, A., Clabbers, A., Dixon, R., Fix-Stenzel, S., Friedman, M., Gaumont, Y., George, D., Gordon, T., Grongsaard, P., Jansen, B., Jia, Y., Moskey, M., Quinn, C., Salmeron, A., Thomas, C., Wallace, G., Wishart, N., and Yu, Z. (2009) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 1722–1725
- Li, Y. L., Torchet, C., Vergne, J., and Maurel, M. C. (2007) *Biochimie* **89**, 1257–1263
- Li, Y. L., Vergne, J., Torchet, C., and Maurel, M. C. (2009) *FEBS J.* **276**, 303–314
- Green, N., Hu, Y., Janz, K., Li, H. Q., Kaila, N., Guler, S., Thomason, J., Joseph-McCarthy, D., Tam, S. Y., Hotchandani, R., Wu, J., Huang, A., Wang, Q., Leung, L., Pelker, J., Marusic, S., Hsu, S., Telliez, J. B., Hall, J. P., Cuozzo, J. W., and Lin, L. L. (2007) *J. Med. Chem.* **50**, 4728–4745
- George, D., Friedman, M., Allen, H., Argiriadi, M., Barberis, C., Bischoff, A., Clabbers, A., Cusack, K., Dixon, R., Fix-Stenzel, S., Gordon, T., Janssen, B., Jia, Y., Moskey, M., Quinn, C., Salmeron, J. A., Wishart, N., Woller, K., and Yu, Z. (2008) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 4952–4955
- Rodríguez, C., López, P., Pozo, M., Duce, A. M., López-Pelaéz, M., Fernández, M., and Alemany, S. (2008) *Cell. Signal.* **20**, 1625–1631
- Giannini, E., Lattanzi, R., Nicotra, A., Campese, A. F., Grazioli, P., Screpanti, I., Balboni, G., Salvadori, S., Sacerdote, P., and Negri, L. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 14646–14651
- Rittner, H. L., Brack, A., Machelska, H., Mousa, S. A., Bauer, M., Schäfer, M., and Stein, C. (2001) *Anesthesiology* **95**, 500–508
- Perruche, S., Kleinclaus, F., Lienard, A., Robinet, E., Tiberghien, P., and Saas, P. (2004) *J. Immunol. Methods* **294**, 53–66
- Gross, S., Gammon, S. T., Moss, B. L., Rauch, D., Harding, J., Heinecke, J. W., Ratner, L., and Piwnica-Worms, D. (2009) *Nat. Med.* **15**, 455–461
- Bhatia, M., Sidhapuriwala, J., Moochhala, S. M., and Moore, P. K. (2005) *Br. J. Pharmacol.* **145**, 141–144
- Traves, P. G., Hortelano, S., Zeini, M., Chao, T. H., Lam, T., Neuteboom, S. T., Theodorakis, E. A., Palladino, M. A., Castrillo, A., and Bosca, L. (2007) *Mol. Pharmacol.* **71**, 1545–1553
- Kingery, W. S., Guo, T., Agashe, G. S., Davies, M. F., Clark, J. D., and Maze, M. (2001) *Brain Res.* **913**, 140–148
- Gantner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S., and Underhill, D. M. (2003) *J. Exp. Med.* **197**, 1107–1117
- Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D., and Rothstein, G. (1982) *J. Invest. Dermatol.* **78**, 206–209
- Haqqani, A. S., Sandhu, J. K., and Birnboim, H. C. (1999) *Anal. Biochem.* **273**, 126–132
- El Kebir, D., József, L., Pan, W., Wang, L., Petasis, N. A., Serhan, C. N., and Filep, J. G. (2009) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**, 311–319
- Haegens, A., Heeringa, P., van Suylen, R. J., Steele, C., Aratani, Y., O'Donoghue, R. J., Mutsaers, S. E., Mossman, B. T., Wouters, E. F., and Vernooy, J. H. (2009) *J. Immunol.* **182**, 7990–7996
- El Kebir, D., József, L., Pan, W., and Filep, J. G. (2008) *Circ. Res.* **103**, 352–359
- Lau, D., Mollnau, H., Eiserich, J. P., Freeman, B. A., Daiber, A., Gehling, U. M., Brümmer, J., Rudolph, V., Münzel, T., Heitzer, T., Meinertz, T., and Baldus, S. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 431–436
- Marchand, F., Perretti, M., and McMahon, S. B. (2005) *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 521–532
- Verri, W. A., Jr., Cunha, T. M., Parada, C. A., Poole, S., Cunha, F. Q., and Ferreira, S. H. (2006) *Pharmacol. Ther.* **112**, 116–138
- Coxon, A., Tang, T., and Mayadas, T. N. (1999) *J. Exp. Med.* **190**, 923–934
- Frossard, J. L., Saluja, A. K., Mach, N., Lee, H. S., Bhagat, L., Hadenque, A., Rubbia-Brandt, L., Dranoff, G., and Steer, M. L. (2002) *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **283**, L541–L548
- Cowburn, A. S., Cadwallader, K. A., Reed, B. J., Farahi, N., and Chilvers, E. R. (2002) *Blood* **100**, 2607–2616
- Cunha, T. M., Verri, W. A., Jr., Silva, J. S., Poole, S., Cunha, F. Q., and Ferreira, S. H. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 1755–1760
- McMahon, S. B. (1996) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **351**, 431–440
- Safieh-Garabedian, B., Poole, S., Allchorne, A., Winter, J., and Woolf, C. J. (1995) *Br. J. Pharmacol.* **115**, 1265–1275
- Woolf, C. J., Allchorne, A., Safieh-Garabedian, B., and Poole, S. (1997) *Br. J. Pharmacol.* **121**, 417–424

61. Guerrero, A. T., Verri, W. A., Jr., Cunha, T. M., Silva, T. A., Schivo, I. R., Dal-Secco, D., Canetti, C., Rocha, F. A., Parada, C. A., Cunha, F. Q., and Ferreira, S. H. (2008) *J. Leukocyte Biol.* **83**, 122–130
62. Eliopoulos, A. G., Davies, C., Blake, S. S., Murray, P., Najafipour, S., Tschlis, P. N., and Young, L. S. (2002) *J. Virol.* **76**, 4567–4579
63. Souza, G. E., Cunha, F. Q., Mello, R., and Ferreira, S. H. (1988) *Agents Actions* **24**, 377–380
64. Ribeiro, R. A., Souza-Filho, M. V., Souza, M. H., Oliveira, S. H., Costa, C. H., Cunha, F. Q., and Ferreira, H. S. (1997) *Int. Arch. Allergy Immunol.* **112**, 27–35
65. Olynych, T. J., Jakeman, D. L., and Marshall, J. S. (2006) *J. Allergy Clin. Immunol.* **118**, 837–843
66. Medzhitov, R. (2008) *Nature* **454**, 428–435
67. Verri, W. A., Jr., Cunha, T. M., Magro, D. A., Guerrero, A. T., Vieira, S. M., Carregaro, V., Souza, G. R., Henriques, M. G., Ferreira, S. H., and Cunha, F. Q. (2009) *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol* **379**, 271–279

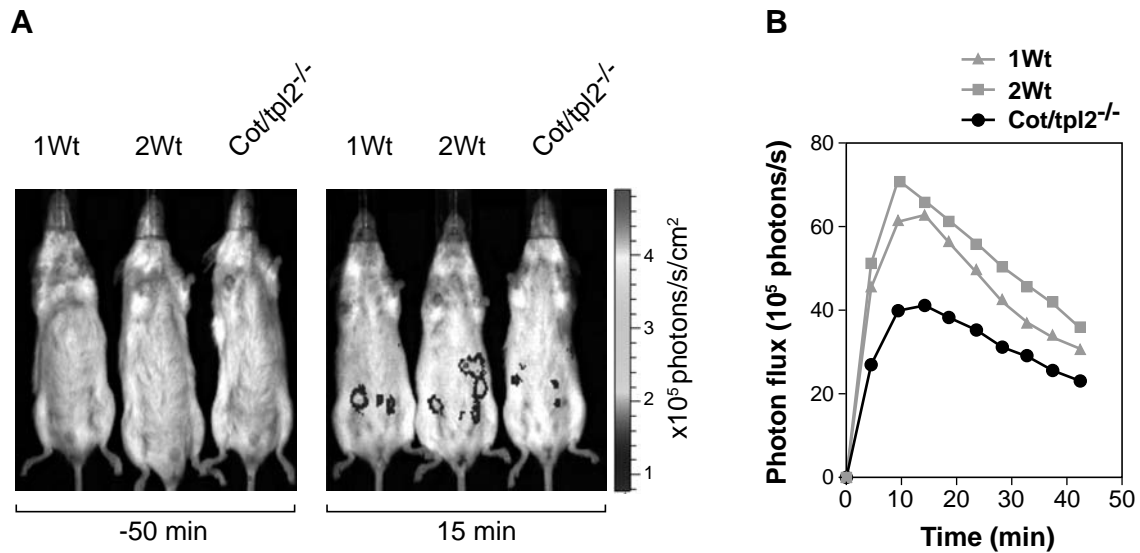


**Supplementary Fig. 1. Impaired Erk1/2 phosphorylation in Cot/tpl2 deficient bone marrow derived macrophages by zymosan.** Shown here is the incapacity of zymosan to provoke p-Erk1/2 phosphorylation in Cot/tpl2<sup>-/-</sup> deficient bone marrow derived macrophages (BMDM). Activation of IKKβ is required to activate Cot/tpl2 (Waterfield, et al. 2003, *Mol Cell* 11:685-694), and as shown here in both Wt and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> BMDM IκBα is degraded after zymosan-stimulation, indicating an activation of IKKβ complex. Wt and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> BMDM were stimulated with zymosan (10 μg/ml) for 20 and 60 min. The phosphorylation state of Erk1/2, as well as Cot/tpl2 and IκBα levels were determined by Western Blot analysis. As a control of protein loaded, total Erk2 levels were tested. The antibodies used were anti-Cot/tpl2 and anti-Erk2 (Santa Cruz, Biotechnology) and p-Erk1/2 and IκBα (Cell Signalling). Similar results were obtained in three different experiments.



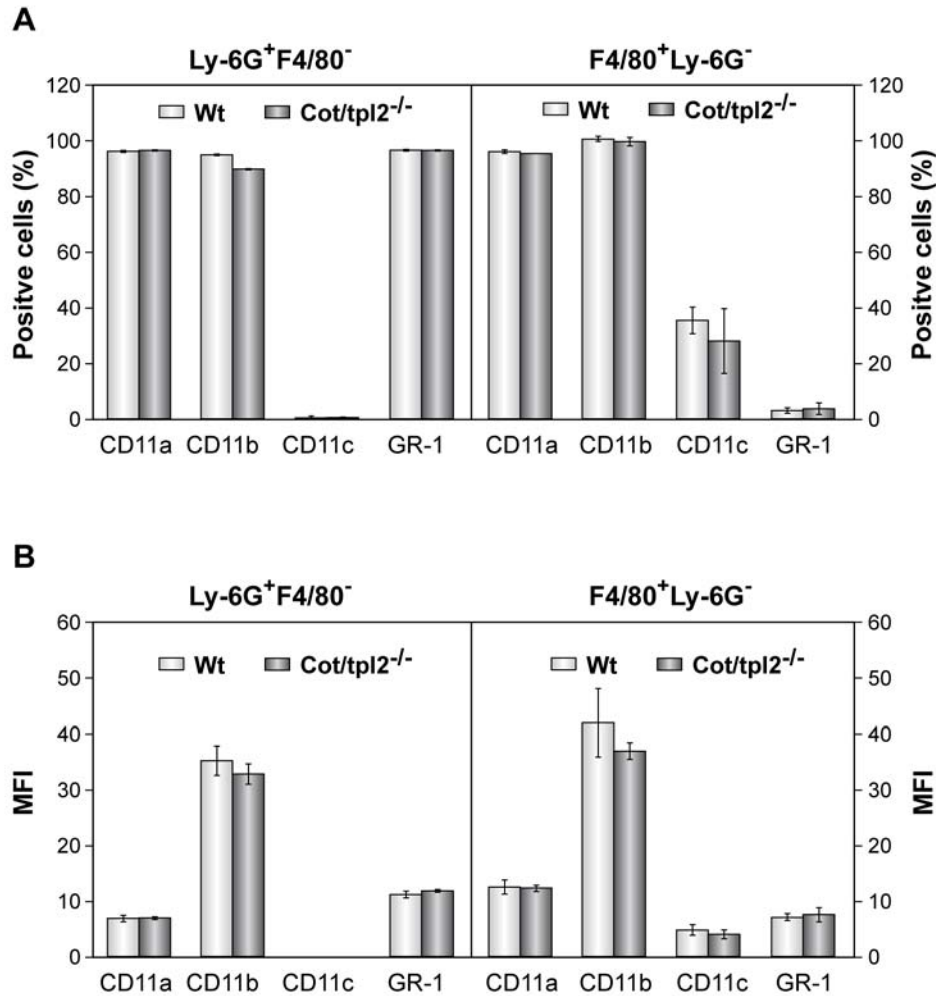
**Supplementary Fig. 2. Cot/tpl2 regulates the number of neutrophils (Ly-6G<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup>) in zymosan-injected hindpaws.** Six hours after the hindpaw intraplantar injection of zymosan (30  $\mu$ g, 300  $\mu$ l) in Wt and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice intraplantar tissues were digested with collagenase and hyaluronidase. Isolated cells were resuspended in PBS 0.1% BSA, pretreated with CD16/32 (2.4G2, Fc block, CultiGen) and subsequently stained with F4/80 (rat anti-mouse, eBioscience) and Ly-6G (rat anti-mouse, Pharmingen) or their corresponding isotype controls (Pharmingen). The cell samples were resuspended in PBS and analysed by flow cytometry using TruCOUNT tubes (BD), data were examined using the CXP program. **A.** Representative side angle light scatter (SS) signal versus forward angle light scatter (FS) profile of the intraplantar isolated cells. Shown are the AJ gate (microbeads) and W1 events as well as N gate (digested intraplantar tissue) and W2 events. **B.** Representative FACS profile of the isolated intraplantar cells (AJ gate) stained with the isotype controls. **C.** Representative FACS profile of the isolated intraplantar cells (AJ gate) stained for F4/80<sup>+</sup> and Ly-6G<sup>+</sup>. A-C. Wt cells, left panel and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> cells, right panel. A,C. One representative experiment of the 4 performed is shown.



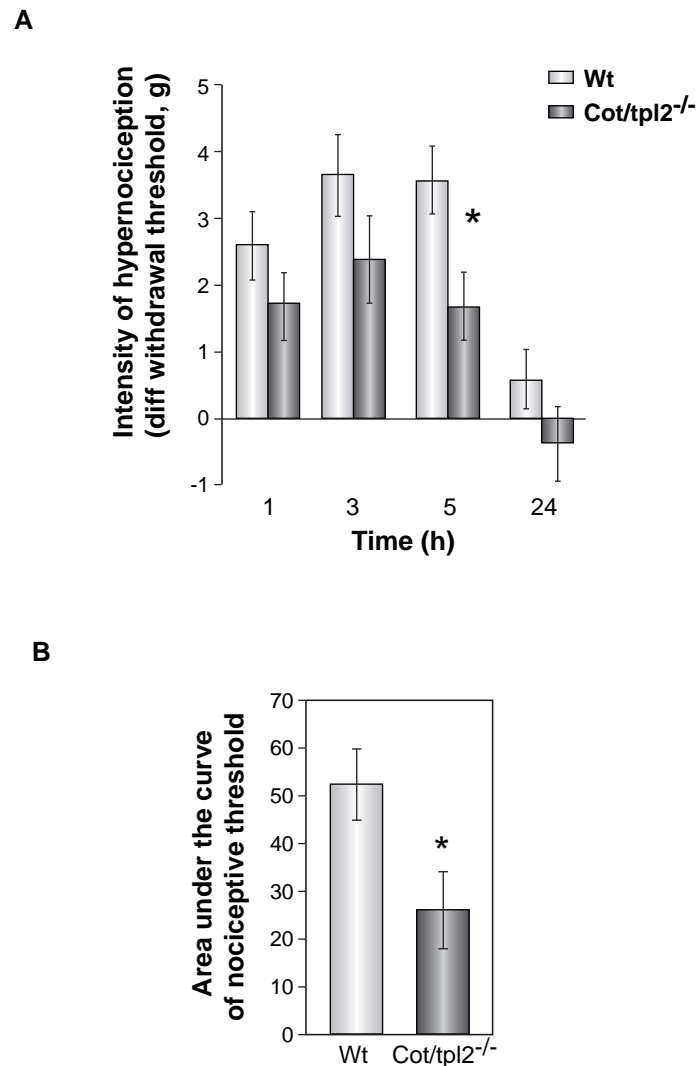


**Supplementary Fig. 3. Luminol-mediated bioluminescence in Wt and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice 4 h after intraperitoneal injection of zymosan.** A. Shown are bioluminescence images of one representative experiment performed with 2 Wt and 1 Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice 4 h after zymosan-induced peritonitis. The images have been taken before and 15 min after intraperitoneal luminal injection, as previously described (Gross, et al, 2009 Nat Med **15** 455-461). B. Representation of the photon influx recorded in A. A,B One representative experiment of the 4 performed is shown.

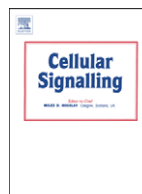
Supplementary Fig. 4



**Supplementary Fig. 4. Cot/tpl2 does not modulate CD11a, CD11b, CD11c and GR-1 expression on zymosan-activated Ly-6G<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> and F4/80<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup> peritoneal cells.** A. Histograms represent the percentage of Ly-6G<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> or F4/80<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup> cells isolated from the peritoneum of Wt and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice positive for CD11a, CD11b, CD11c and GR-1 staining 4 h following 1 mg of zymosan injection. Both Ly-6G<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> or F4/80<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup> cells from Wt and Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice were negative for CD31, CD62L, and CD49 staining. B. Quantitative analysis of fluorescence staining for CD11a, CD11b, CD11c, and GR-1 of the double positive Ly-6G<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> or F4/80<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup> cells indicated in A. A, B. Values represent the means fluorescence intensity (MFI) means  $\pm$  SEM of 6 independent experiments.



**Supplementary Fig. 5. Cot/tpl2 modulates LPS induced hypernociception.** The sensitivity to mechanical stimulus following interplantar application of LPS (8 ng, 25  $\mu$ l, Sigma L7261) showed an increase following the injection. The baseline withdrawal threshold was 7.1  $\pm$  0.3 g (n=12; mean  $\pm$  SEM). **A.** The Cot/tpl2<sup>-/-</sup> mice had less pronounced changes in the withdrawal thresholds after the LPS injection in comparison to Wt, this difference being the most pronounced at 5 h (p=0.022, n=6, 2-way ANOVA, Tukey post-hoc). The area under the curve is also shown (lower panel). **B.** The changes in nociceptive threshold and withdrawal latency were calculated for each mouse as the area under the curve versus time (over a 24 h period) and the results are presented as the means  $\pm$  SEM (p=0.040, Students T-test).



# COX2 expression and Erk1/Erk2 activity mediate Cot-induced cell migration <sup>☆</sup>

Cristina Rodríguez, Pilar López, Maite Pozo, Antonio Martín Duce, Marta López-Pelaéz, Margarita Fernández, Susana Alemany <sup>\*</sup>

Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Dpto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, UAM, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 8 April 2008

Accepted 12 May 2008

Available online 23 May 2008

### Keywords:

Cot/tpl-2 (MAPKKK8)

Migration

Erk1/Erk2

COX2

## ABSTRACT

The MAPKKK8 Cot/tpl-2, identified as an oncogene (Cot-T), participates in the intracellular signaling activated by members of the TLR and TNF $\alpha$  receptor superfamilies. Here we demonstrate that Cot promotes cell migration by regulating different steps involved in this process, such as cell adhesion and metalloproteinase activity. Indeed, Cot also regulates the cytoskeleton and Cot-T overexpression provokes the polarization of microtubules and the loss of stress fibers. Moreover, and in accordance with the increased Rac-GTP levels observed, Cot-T overexpressing cells develop more lamellipodia than control cells. Conversely, depletion of endogenous Cot increases the formation of stress fibers which is correlated with the high levels of Rho-GTP observed in these cells. In addition, the increase in COX2 expression and the activation of Erk1/2 regulated by Cot are essential for the induction of cell migration. Together, these data provide evidence of a new role for both proto-oncogenic and oncogenic Cot.

Crown Copyright © 2008 Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Cot/tpl-2 (MAPKKK8) is one of the main MAPKKK involved in innate and adaptive immunity, and it is an important negative regulator of T<sub>H</sub>1-type adaptive immunity [1]. More recently, Cot/tpl-2 ablation in mice was shown to markedly reduce pancreatic and lung inflammation in murine models of acute pancreatitis [2], evidence that Cot plays a role in inflammatory processes. Indeed, studies in different cell systems have shown that Cot is the only MAPKKK that activates the MEK1-Erk1/Erk2 pathway in response to the activation of the TLR3, TLR4, TLR6, TLR9, TNF $\alpha$ R, CD40, and IL-1R receptors [1,3–7]. Abnormal enhancement of Cot expression increases Erk1/Erk2 and JNK activity [8], and up-regulates the activity of the AP-1, NF- $\kappa$ B, and NFAT transcription factors [9–11]. Moreover, the activation of the Erk1/Erk2 pathway by Cot links its activity with the up-regulation of E2F [12] and CREB [13].

The human Cot gene was identified as an oncogene in a 3' rearrangement that leads to the expression of the truncated/modified Cot-T protein [14]. The first 397 amino acids of the Cot-T oncogene and the proto-oncogenic wild type Cot (wt) are identical. However, the 69 amino acids from the C-terminal of wt Cot contain a sequence that

targets the protein for proteasome degradation [15] and in Cot-T, they are replaced by an 18 amino acids stretch with no sequence homology [14]. This truncation unmasks the transformation capacity of the protein [14,15], although overexpression of the Cot proto-oncogene is also capable of conferring a transformed phenotype in established cell lines [15–17]. Similarly, insertion of the Moloney Leukaemia Virus into the last intron of the rat gene or the insertion of the Mouse Murine Tumour Virus into the mouse homologue also induces cell transformation [18,19]. Indeed, a modification in the 3' region of the Cot gene has been identified in some human adenocarcinomas [20]. Furthermore, high levels of Cot mRNA have been detected in some human breast cancers [21] and are correlated with human large granular lymphocyte disorders [22]. Thus, although Cot is physiologically involved in innate and adaptive immunity, mutations at the Cot locus result in the expression of a protein linked to cell malignancy.

Here, we demonstrate that both overexpression of oncogenic Cot and depletion of endogenous Cot modulate cell migration by regulating different steps involved in this process. We also provide evidence that the regulation of cell migration by Cot is mediated by its capacity to increase Erk1/Erk2 activity and the expression of the COX2 protein.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Cell culture, transfection and selection

HeLa cells were transfected with the puromycin resistant plasmids as described previously [7]: pCLx; pCLx-Cot-T; pSR; pSR-scrambled siRNA containing the sequence 5'-ccggatagttcagcgaaa-3'; or with a mixture of pSR-368-Cot plus pSR-525-Cot siRNA containing the nucleotides 368–386 (5'-tagattccgatgttctct-3') and the nucleotides 525–543 (5'-gccatctgatgtggaaatc-3'), respectively. Positive transfected cells were selected by adding puromycin (1  $\mu$ g/ml, Gibco-BRL) to the incubation media for 24 h. As a control, non-transfected cells were also exposed to puromycin [7].

<sup>☆</sup> We thank Drs. Iñiguez and Fresno for the p3x-Nf- $\kappa$ B Luc plasmid. This work was supported by the SAF 2005-00392 grand and the "Fundación-Mutua-Madrileña". LP is the recipient of a FPU fellowship.

<sup>\*</sup> Corresponding author. IIB-CSIC, Arturo Duperier 4, Madrid, Spain. Tel.: +34 91 4975418; fax: +34 91 5854401.

E-mail address: [salemany@iib.uam.es](mailto:salemany@iib.uam.es) (S. Alemany).

## 2.2. Western blots and luciferase assays

Western blots of puromycin selected cell extracts incubated for 20 h in 0.1% FBS/DMEM were repeated at least three times producing similar results. The membranes were probed with antibodies against Cot (Calbiochem or Santa Cruz), p-JNK, p-Erk1/Erk2, Erk2 (Cell Signalling), COX2 (Transduction Laboratories), or pDI [15], as described previously [7]. For luciferase assays, cells were transfected with pclx (3.6 µg) or pclx-Cot-T (3.6 µg) together with p3x-NfκB-Luc (1.3 µg), and they were cultured for 24 h before luciferase activity was measured [23].

## 2.3. Invasion, migration, and adhesion assays

Matrigel transmigration assays were performed as described previously [24], with some minor modifications. Transfected and selected HeLa cells were added to the upper side of the inserts and incubated for 24 h. Cells from 10 fields on the lower and on the top surface of the filter were counted under a light microscope. The percentage of transmigration was determined as:  $[\Sigma \text{ cells on the bottom} / \Sigma \text{ total cells}] \times 100$ . Wound healing migration assays were performed on confluent cell cultures in 1% or 3% FBS/DMEM on matrigel coated plates. Photographs were taken at different times and cell migration was determined as the difference in the wound width (µm) between 0 h and 16 h measured with the Act 2U Nikon tool. The different drugs (Sigma, Tocris) were added 2 h before wounding and maintained throughout the assay, and cell viability was tested after each assay by trypan blue exclusion (>95%). To perform cell adhesion assays, cells incubated for 20 h in DMEM supplemented with 50% conditioned medium (CM, extracellular medium from NIH3T3 cells cultured in serum-free DMEM for 48 h) were labeled with BCECF-AM (Sigma). Transfected and selected HeLa cells were added to wells coated with different extracellular matrices (fibronectin, 10 µg/ml; vitronectin, 0.3 µg/ml; laminin, 20 µg/ml; or gelatin, 10 µg/ml; Sigma) and incubated for 45 min. Non-adherent cells were removed by PBS washing and adherent cells were quantified at wavelengths of 500 nm excitation and 530 nm emission in a spectrofluorometer.

## 2.4. Isolation of embryonic fibroblasts from Cot/tpl-2 knock-out and wild type mice

Cot/tpl-2 knock-out (KO) mice were generated by homologous recombination by Genoway. In the KO, exons 3 and 4 of Cot are absent in the mutant animals which contain the kinase domain. These KO mice were initially on a 129/SvPas × C57/Bl6 mixed background and they were backcrossed until a 99.9% homogeneous C57/Bl6 background was obtained. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were derived from wt and Cot/tpl-2 KO mice as described previously [25], and MEFs from passage 3–6 were used for wound healing assays in 0.5% FBS/DMEM and 20 ng/ml IL-1 for 16 h, as described above.

## 2.5. Metalloproteinase activity

The extracellular medium from control, Cot-T overexpressing, or Cot-siRNAs cells cultured for 48 h was utilized to perform gel zymography assays as described previously [24]. The extracellular medium of HT1080 cells was run in parallel as a positive control. The bands of metalloproteinase (MMP) activity were quantified by densitometry utilizing the Soft Imaging System program.

## 2.6. DIGE and mass spectrometry

Puromycin selected cells were lysed in lysis buffer (30 mM Tris, pH 7.5, 7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS and protease inhibitors) and extracts of Cot-T overexpressing or Cot-siRNAs cells (75 µg) were run together with control cell extracts (75 µg) in a strip (3–11 pH, 24 cm). The proteins were further separated on 12% SDS-Tris-glycine gels and scanned in a Typhoon 9400 scanner (GE-Healthcare). Mass spectrometry analysis was performed using micropreparative gels (500 µg of protein). Spots of interest were identified in a 4700 MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems) at the Proteomics Center of UC, Madrid (<http://www.ucm.es/proteomica>).

## 2.7. Distribution of actin and tubulin in HeLa cells

Puromycin selected HeLa cells were cultured on fibronectin coated glass slides in 10% FBS/DMEM, incubated in 0.1% FBS/DMEM for 16–24 h, fixed with 2% paraformaldehyde/H<sub>2</sub>O and permeabilized with 0.5% triton/H<sub>2</sub>O. The cells were incubated with phalloidin-FITC (Sigma) or with anti-tubulin (BD) as a primary antibody and then by ALEXA594 (Molecular Probes) as secondary antibody. The cells were counterstained with DAPI (Vector laboratories) and the photographs were then taken at 100× with an Olympus fluorescence microscope coupled to a Nikon digital camera.

## 2.8. Measurement of Rho-GTP and Rac-GTP levels

Puromycin selected cells, were incubated for 20 h in 0.1% FBS/DMEM in the presence or absence of the inhibitors indicated in the figure legend. The cells were washed with PBS and solubilized in the lysis buffer provided with the kit (Quantitative Rho A/B/C-GTP and Rac-GTP G-Lisa Kits, Cytoskeleton). In compliance with the manufacturer's instructions, 50 µg of protein was used to measure Rho A/B/C-GTP or Rac-GTP levels.

## 2.9. Statistical studies

Student's *T*-test was carried out to determine the difference between control and Cot-T overexpressing cells, between control and Cot-siRNAs cells, and between samples with or without drug addition (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001).

## 3. Results

### 3.1. Cot regulates cell migration

To investigate whether Cot activity affects cell migration we manipulated the expression of Cot in HeLa cells, in which Cot plays a role in the intracellular signaling triggered by IL-1 stimulation [7]. In agreement with previous data, endogenous Cot protein expression and phospho-Erk1/Erk2 were clearly diminished in Cot-siRNAs cells (Fig. 1A and [7]). By contrast, the overexpression of Cot-T induced an increase in phospho-Erk1/Erk2 and phospho-JNK (Fig. 1B and [8]), as well as an increase in NF-κB activity (Fig. 1B and [11]). MTT assays performed on these cells in 1% or 3% FBS/DMEM (Fig. 1C), or in 50% CM/DMEM (data not shown) did not reveal any significant difference in cell number, indicating that the changes in Cot expression did not affect cell viability.

To determine whether Cot influences cell migration, we carried out wound healing assays on cells in 1% or 3% FBS/DMEM. As expected, cells transfected with the empty pSR vector, empty pclx vector, or with a pSR-scrambled siRNA plasmid exhibited the same rate of transmigration (Fig. 1D). By contrast, overexpression of Cot-T augmented cell migration to a rate of 58 ± 7% in 3% FBS/DMEM and to 63 ± 19% in 1% FBS/DMEM, from that displayed by control (cnt<sub>2</sub>) cells of 37 ± 9% in 3% FBS/DMEM or 36 ± 14% in 1% FBS/DMEM. Moreover, the migration of Cot-siRNAs cells fell to 11 ± 5.2% in 3% FBS/DMEM and to 8 ± 5% in 1% FBS/DMEM (Fig. 1D). Cot is the only MAPKKK that activates the Erk1/Erk2 pathway in response to IL-1 stimulation [7]. Accordingly, IL-1 stimulation of wt MEFs but not Cot/tpl-2 KO MEFs induced activation of phospho-Erk1/Erk2 (data not shown). In wound healing assays performed on wt and Cot/tpl-2 KO MEFs in 0.5% FBS/DMEM, and in the presence of IL-1, control MEFs have 1.6 fold higher migration rate than Cot/tpl-2 KO MEFs (Fig. 1E).

In the Matrigel transmigration chamber assay, a role for Cot in cell migration was also evident. The proportion of Cot-T overexpressing cells that transmigrated was significantly higher (45 ± 7%) than that of control cells (31 ± 2%). By contrast, fewer cells expressing Cot-siRNAs transmigrated (10 ± 3%, Fig. 2A).

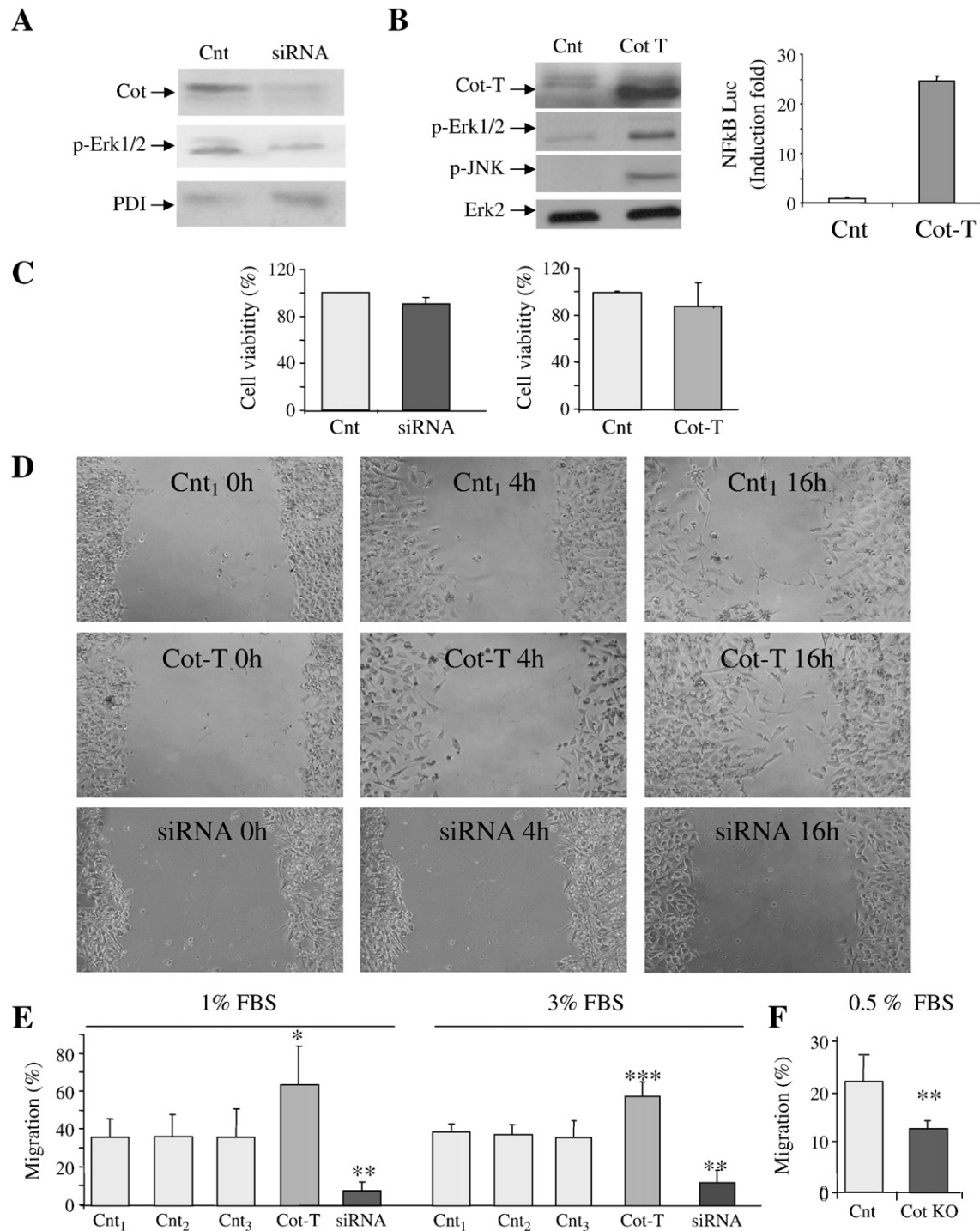
Cleavage of the extracellular matrix by metalloproteinases is essential to allow cells to migrate [26]. The extracellular medium collected from Cot-T overexpressing cells after 48 h had more pro-MMP-9 and pro-MMP-2 activity than the extracellular medium conditioned by control cells. Indeed, mRNA array analysis of control and Cot-T overexpressing cells indicated that Cot-T overexpression induces MMP-2 and MMP-9 mRNA expression in HeLa cells (data not shown). Accordingly, pro-MMP-9, pro-MMP-2, and MMP-2 activity in the extracellular medium from Cot-siRNAs cells is weaker than that from control cells (Fig. 2B).

To investigate whether Cot regulates cell migration through changes in cell adhesion, we compared the adhesion of cells overexpressing Cot-T, control cells, and Cot-siRNAs cells maintained for 20 h in 50% CM/DMEM. Irrespective of the nature of the extracellular substrate Cot-T overexpressing cells showed a 2–4 fold decrease in the number of adherent cells respect to control cells (Fig. 2C). Conversely, Cot-siRNAs cells showed a significant increase in their adhesive capacity (1.4 fold) with respect to control cells on fibronectin coated plates (Fig. 2D). The capacity of Cot-T overexpressing cells preincubated for the last 20 h in 1% or 3% FBS/DMEM to adhere to fibronectin or laminin was also significantly impaired (data not shown).

### 3.2. Induction of COX2 expression and Erk1/Erk2 activity mediates the migration induced by Cot

To identify possible changes in the expression of a protein that might mediate the induction of cell migration by Cot, DIGE proteome

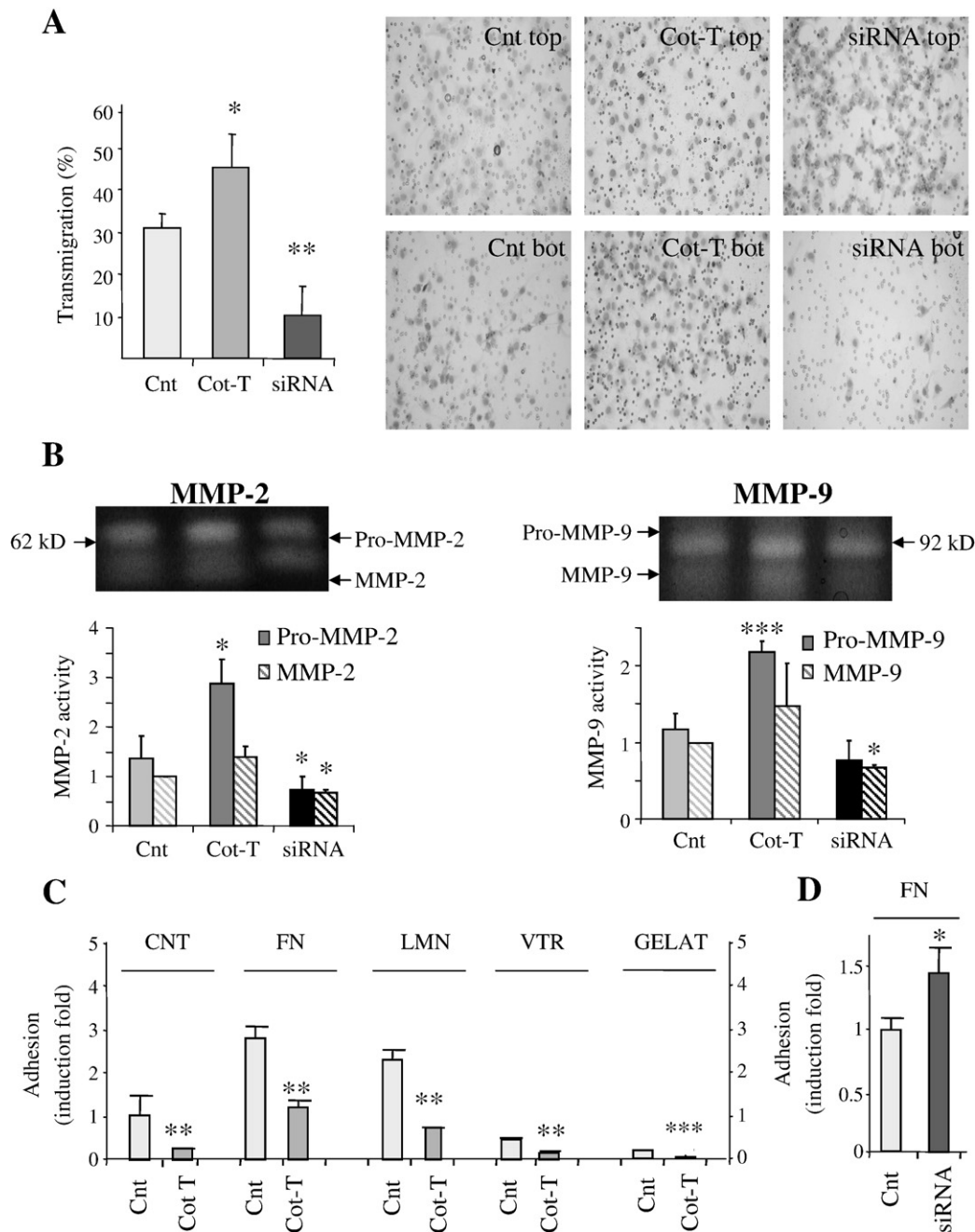




**Fig. 1.** Cot regulates cell migration. (A) Western blot analysis of cells transfected with pSR (control) or with a mixture of pSR-368-Cot plus pSR-525-Cot plasmids (siRNA), and probed with anti-Cot (Santa Cruz), anti-p-Erk1/Erk2, and anti-PDI antibodies. (B) Western blot of cells transfected with pSR (control) or pSR-Cot-T (Cot-T) plasmids and probed with anti-Cot (Calbiochem), anti-p-Erk1/Erk2, anti-p-JNK and anti-Erk2 antibodies. Luciferase activity represents the mean  $\pm$  SD of 3 measurements performed in triplicate. (C) MTT assay of cells transfected with pSR (control), a mixture of the pSR-Cot-siRNAs (siRNA), pSR (control) or pSR-Cot-T (Cot-T) incubated for 24 h in 1% FBS/DMEM. Graphs show the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate, the control value is regarded as 100%. (D) Cells transfected with pSR (cnt1), pSR-Cot-T (cnt2), pSR-scrambled siRNA (cnt3), pSR-Cot-T (Cot-T) and pSR-Cot siRNAs (siRNA) plasmids were examined in cell migration assays in 1% or 3% FBS/DMEM. Photographs of one representative experiment of cnt1, Cot-T and siRNA cells carried out in 1% FBS/DMEM. The graphs show the mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments performed in triplicate of cnt1, cnt2, cnt3, Cot-T, and siRNA cells, and wound repair is expressed as the percentage of the initial wound area after 16 h. (E) Would healing cell migration assays performed with Cot/tpl-2 KO and wt MEFs in 0.5% FBS and 20 ng/ml IL-1. The graph shows the mean  $\pm$  SD of percentage wound repair after 18 h of wt (control) and Cot/tpl-2 KO (Cot KO) MEFs.

analysis was performed between HeLa cells expressing different levels of Cot. The DIGE proteome analysis between control and Cot-siRNAs cells did not identify any consistent or significant change, however a comparison of control cells and cells overexpressing Cot-T showed that the expression of one protein was consistently and significantly

(5.3-fold) induced in cells overexpressing the Cot-T. Mass spectrometry identified this protein as COX2 (Fig. 3A) and in western blots, we confirmed that Cot-T overexpressing cells contain more COX2 protein than control or Cot-siRNAs cells (Fig. 3B). The induction of COX-2 by Cot-T was also observed when HeLa cells were incubated in



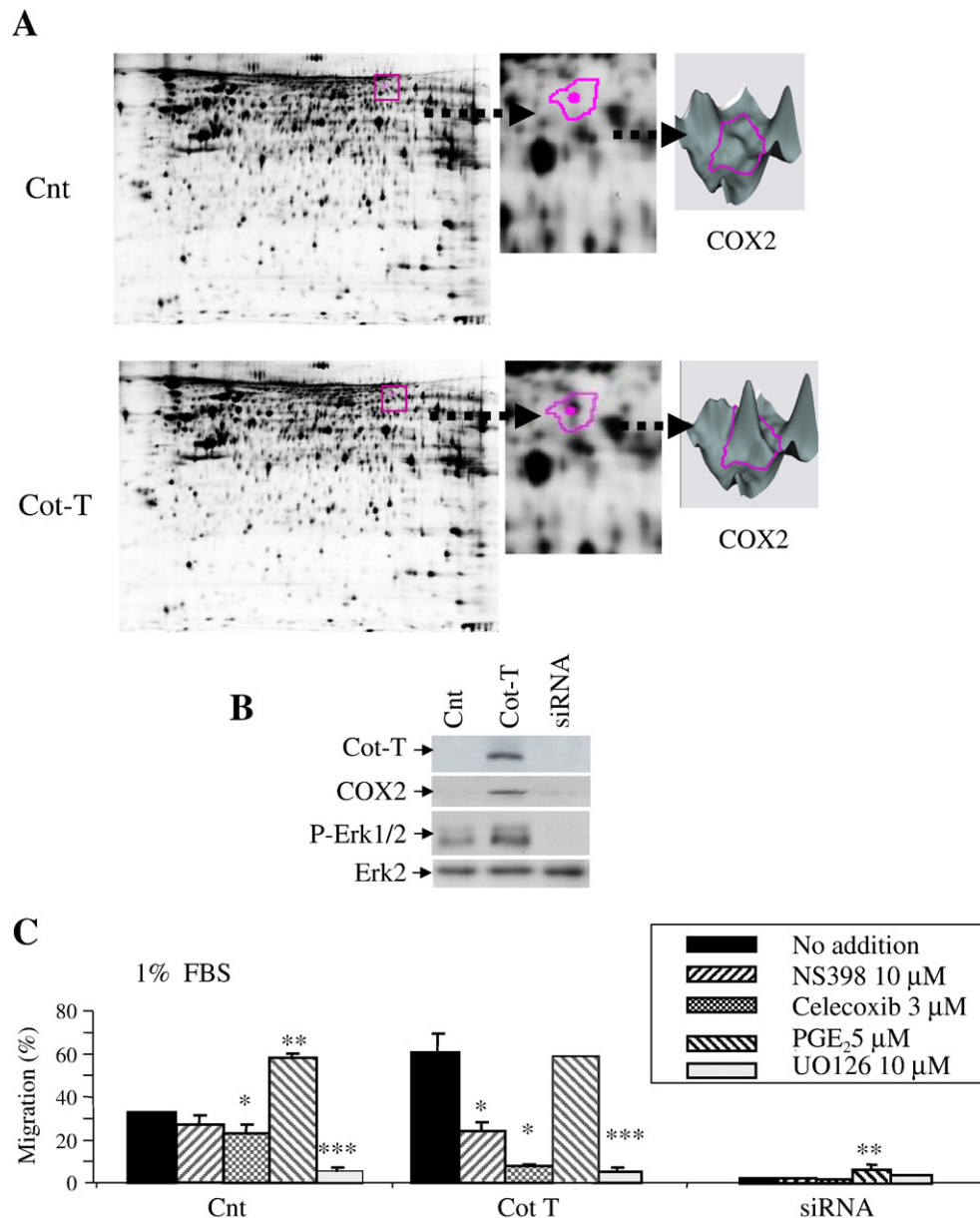
**Fig. 2.** Cot regulates cell transmigration, metalloproteinase activity and cell adhesion. (A) The graph shows the mean  $\pm$  SD of the proportion of cells that migrated through the matrigel with respect to the total cells from 6 experiments performed in duplicate with pSR (control), pCot-T (Cot-T), and pSR-Cot siRNAs (siRNA) transfected cells. Cells transfected with pCot-T or with pSR-scrambled siRNA showed the same transmigration rate as cells transfected with the pSR plasmid. Photographs show one of the 10 representative areas counted per insert per experiment of control (pSR transfected), Cot-T (pCot-T transfected) and siRNA (pSR-Cot siRNAs transfected) cells. (B) Graphs show the mean  $\pm$  SD of 5 independent experiments of the pro-MMP-2, MMP-2, pro-MMP-9, and MMP-9 activity in control (pSR transfected), Cot-T (pCot-T transfected) and siRNA (pSR-Cot siRNAs transfected) cells. The value 1 corresponds to the MMP-2 and MMP-9 activity in control cells. The metalloproteinase activity of cells transfected with pCot-T or pSR-scrambled siRNA was no different to that of cells transfected with pSR. The photograph shows the gelatin–gel zymography bands of one representative experiment of control (pSR transfected), Cot-T (pCot-T transfected) and siRNA (pSR-Cot siRNAs transfected) cells. (C) The figure shows the mean  $\pm$  SD of three independent cell adhesion assays carried out on fibronectin (10  $\mu$ g/ml, FN), vitronectin (0.3  $\mu$ g/ml, VTR), laminin (20  $\mu$ g/ml, LMN) or gelatin (10  $\mu$ g/ml, GELAT), and performed in triplicate with cells transfected with the pCot-T (control) or pCot-T plasmids (Cot-T). (D) The figure shows the mean  $\pm$  SD of three independent cell adhesion assays carried out in triplicate on fibronectin (10  $\mu$ g/ml, FN) with cells transfected with pSR-scrambled siRNA (control) or with a mixture of the pSR-Cot siRNA (siRNA) plasmids.

different media (1% or 3% FBS/DMEM, or 50% CM/DMEM), and mRNA array analysis of control and Cot-T overexpressing cells further indicated that COX2 mRNA levels are induced by Cot-T overexpression in HeLa cells (data not shown).

Significantly, an increase in COX2 expression has been associated with cell migration of human colon and breast cancer cells [27,28]. Thus, to determine whether COX2 mediated the enhanced migration of Cot-T overexpressing cells, we performed wound healing migration

assays with the different puromycin selected HeLa cells in the presence of specific COX2 inhibitors. The inclusion of NS398 or Celecoxib in the wound healing assays inhibited Cot-T overexpressing cell migration by about 60%, to the levels observed with control cells (Fig. 3C). Furthermore, addition of PGE<sub>2</sub> to the wound healing assays, a product of COX2 activity that promotes cell migration [27,29], increased the migration rate of control cells by about 2 fold, to the rate of Cot-T overexpressing cells. Addition of PGE<sub>2</sub> did not promote





**Fig. 3.** COX2 expression and Erk1/Erk2 activity mediate cell migration induced by Cot. (A) 2D gel DIGE images and the COX2 spot from pclx (control) and pclx-Cot-T transfected (Cot-T) cells. (B) Western blots of cells transfected with pclx (control), pclx-Cot-T (Cot-T) or with pSR-Cot siRNA plasmids (siRNA) and probed with anti-Cot (Calbiochem), anti-phospho-Erk1/Erk2 or anti-Erk2 antibodies. (C) The graphs show the mean  $\pm$  SD of 3 independent wound healing migration assays in 1% FBS/DMEM performed in triplicate with control (pSR transfected), Cot-T (pSR-Cot-T transfected), and siRNA (pSR-Cot siRNAs transfected) cells in the presence or absence of 10  $\mu$ M NS398, 3  $\mu$ M Celecoxib, 5  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> or 10  $\mu$ M UO126.

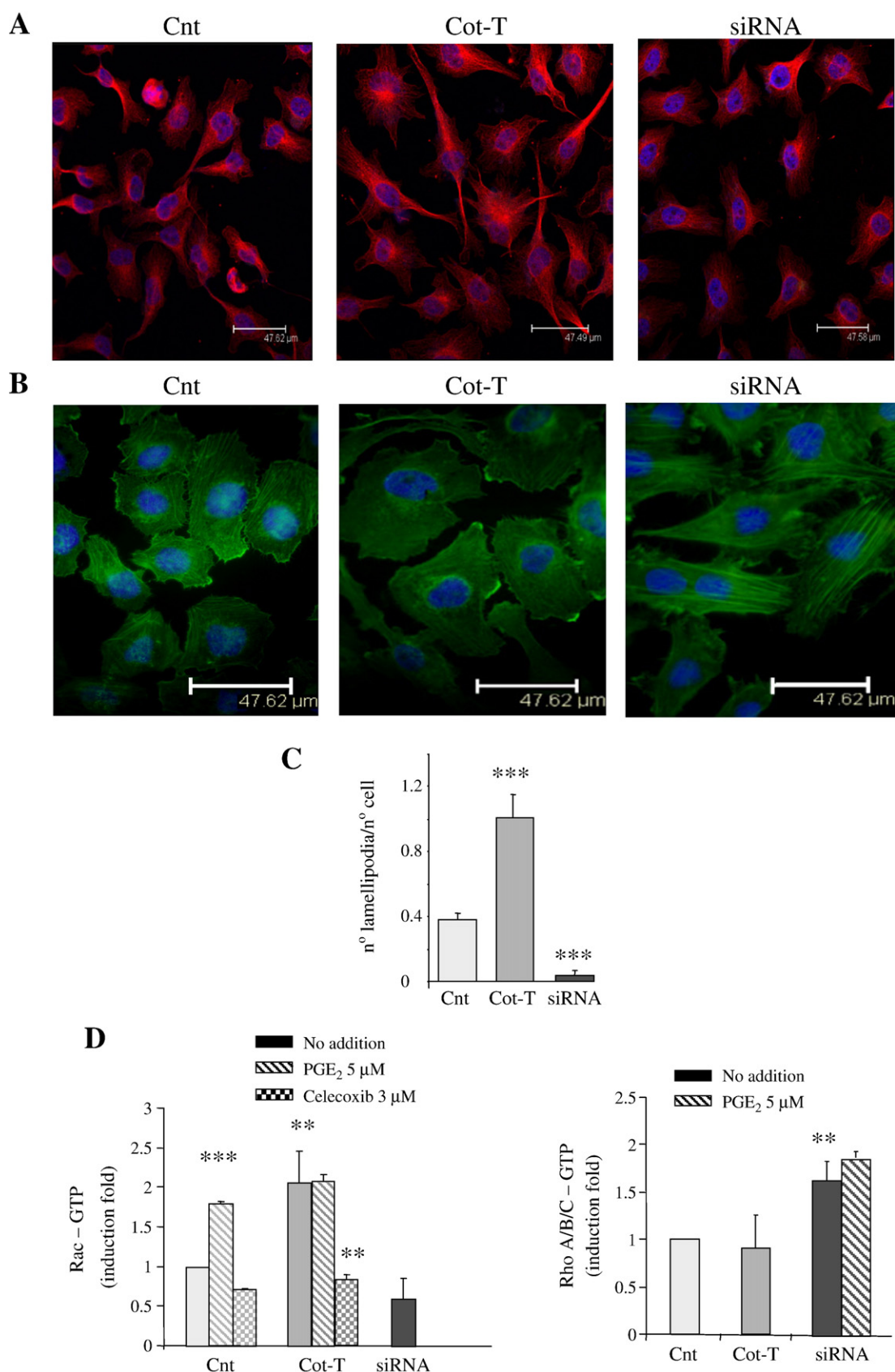
the migration of Cot-siRNAs cell to that observed in Cot-T overexpressing cells or control cells, and moreover, PGE<sub>2</sub> did not modify the capacity of Cot-T overexpressing cells to migrate.

One of the differences observed between Cot-siRNA, control, and Cot-T overexpressing cells resides in the levels of phospho-Erk1/Erk2 (Figs. 1A, B and 3B). Thus, the role of Erk1/Erk2 activity on the capacity of Cot to induce migration was evaluated. Cell migration assays were performed in the presence of UO126, an inhibitor of Erk1/Erk2 activity, and the addition of UO126 to control and Cot-T overexpressing cells drastically reduced their capacity to migrate (Fig. 3C).

### 3.3. Cot affects the organization of the cytoskeleton and the levels of Rho-GTP and Rac-GTP

We studied whether the effects of Cot on cell migration were correlated with changes in cytoskeletal organization by examining the

cytoskeleton in control, Cot-T overexpressing and Cot-siRNAs cells cultured on fibronectin. The microtubules in Cot-siRNAs cells adopted a perinuclear ring-like structure characteristic of attached and non-migratory cells, whereas the microtubules were polarized throughout the cytoplasm in Cot-T cells (Fig. 4A). This microtubule polarization contributes to the formation of lamellipodia [30] and indeed, phalloidin staining revealed more lamellipodia in Cot-T overexpressing cells than in control or Cot-siRNAs cells (Fig. 4A, B). This increase in the formation of lamellipodia was coupled to an increase in the levels of Rac-GTP in Cot-T overexpressing cells (2.07  $\pm$  0.39) when compared to control or Cot-siRNAs cells. This 2-fold increase was blocked by preincubation with Celecoxib, indicating that the increase in the Rac-GTP levels by Cot-T was mediated by COX2. Nevertheless, the addition of PGE<sub>2</sub> to control cells increased the levels of Rac-GTP to that observed in Cot-T overexpressing cells (Fig. 4C). By contrast, the phalloidin staining of the different transfected cells also showed that Cot-siRNAs developed abundant



**Fig. 4.** Cot regulates cytoskeletal reorganization as well as the levels of Rho A/B/C-GTP and Rac-GTP. Cells transfected with the pSR (control), pSR-Cot-T (Cot-T) or pSR-Cot siRNAs (siRNA) plasmids were cultured on fibronectin coated plates, and stained with DAPI and (A) anti- $\beta$ -tubulin (1:200, Sigma) or (B) phalloidin-FITC (1:200, Sigma). Similar results were obtained with 4 different sets of transfected cells (C). The graph shows the no. of lamellipodia/no. of cells from 10 fields of Cot-T overexpressing, control and Cot-siRNAs cells stained with phalloidin from 4 different experiments. (D) The panels show the mean  $\pm$  SD of 3 experiments performed in duplicate to measure the Rho A/B/C-GTP and Rac-GTP levels in Cot-T overexpressing, control and Cot-siRNAs cells maintained in the presence or absence of PGE<sub>2</sub> or Celecoxib. The value of 1 corresponds to control cells with no added drug. The positive control provided by the Rho A/B/C-GTP kit produced a value of  $2.02 \pm 0.36$  and that provided by the Rac-GTP kit produced a value of  $1.98 \pm 0.32$ .

stress fibers (Fig. 4A). In addition, and in agreement with the relationship established between Rho-GTP levels and stress fiber formation [31,32] Rho-GTP levels increased  $1.64 \pm 0.21$  fold in Cot-siRNAs cells with respect to control cells, and preincubation with PGE<sub>2</sub> could not block this induction.

#### 4. Discussion

Cot gene, identified an oncogene, is involved physiologically in immunity and inflammatory processes, and we demonstrate here that cells containing different levels of Cot have different migrations rates. Cell migration requires cytoskeletal reorganization and accordingly cells overexpressing Cot-T and cells in which Cot is depleted display differences in the structure of the cytoskeleton. Overexpression of Cot-T induced the polarization of microtubules, structures involved in maintaining cell shape and cell motility [33]. The polarization of microtubules leads to cell elongation and allows the end of the microtubules to approach the plasma membrane where they can stimulate lamellipodia formation [30,33]. Indeed, Cot-T overexpressing cells develop more lamellipodia and these cells also express higher levels of Rac-GTP than control cells, in agreement with the capacity of Rac-GTP to regulate lamellipodia formation [33–35]. However, it should be noted that Cot depleted cells contain similar levels of Rac-GTP but fewer lamellipodia per cell than control cells. By contrast, the incapacity to phosphorylate Erk1/Erk2 was shown to be correlated with an increase in the presence of stress fibers [36]. Moreover, although Rho activity is required for cell migration, excessive Rho activity induces the appearance of stress fibers and inhibits migration [32,37]. This seems to occur in Cot depleted cells that exhibit abundant stress fibers as well as increased Rho-GTP levels, and in which phosphoErk1/Erk2 was less prevalent than in control cells. Additionally, the perinuclear ring-like microtubule structure observed in Cot depleted cells is characteristic of non-migratory cells.

Cot activity promotes cell migration due to its capacity to regulate Erk1/Erk2 activity and COX2 expression. In fact, our DIGE analysis indicates that the protein that undergoes the most important change in expression following Cot-T overexpression in HeLa cells is COX2. In this context it should be noted that in Epstein Barr Virus associated malignancies, like gastric cancer and nasopharyngeal carcinoma, a link between Cot overexpression and COX2 induction has been proposed [38]. Indeed, we previously showed that overexpression of Cot-T induces Cox-2 promoter transcription in a Jurkat cell line by activating the distal (–105/–97) and proximal (–71/–61) NFAT responses elements in the human COX-2 promoter, thereby increasing COX-2 mRNA expression [10]. Furthermore, endogenous Cot mediates the induction of COX2 and PGE<sub>2</sub> production in murine macrophages via Erk1/Erk2, due to the ability of these MAP kinases to activate p90RSK and Msk1, which in turn phosphorylate and activate CREB and the COX2 promoter [13]. The mechanism by which Cot activity up-regulates COX2 expression in HeLa cells remains to be established. However, considering that Erk1/Erk2 and NFκB activation increases COX2 expression in HeLa cells and in closely related cell lines [39–41], and since Cot-T up-regulates both Erk1/Erk2 and NFκB activity (Fig. 1A), it is likely that the activation of these two pathways by Cot-T mediates the up-regulation of COX2 expression in HeLa cells.

Our data demonstrate that the increase in COX2 expression induced by non-physiological up-regulation of Cot is the cause of the different migration rates between control and Cot-T overexpressing cells. In fact PGE<sub>2</sub>, a product of COX2 activity, enhances the migration of control cells to that observed by Cot-T overexpressing cells. Moreover, the addition of COX2 inhibitors blocks the migration induced by Cot-T overexpression, and neither PGE<sub>2</sub>, nor NS398 or Celecoxib can modulate the phospho-Erk1/Erk2 levels in HeLa cells (data not shown). On the other hand, the reduced migration of endogenous Cot depleted cells with respect to control cells in two different cell

systems indicates that Cot is physiologically involved in cell migration. In this case, the different phospho-Erk1/Erk2 levels in control and Cot-T overexpressing cells, are likely to explain the impaired migration of Cot depleted cells. In fact, the inhibition of Erk1/Erk2 phosphorylation in control or Cot-T overexpressing cell dramatically reduces their migration rate. Indeed, COX2 is almost undetectable in control cells and exposure to PGE<sub>2</sub> of Cot depleted cells does not improve their migration to that observed in control cells.

In conclusion, these data together provide evidence of a role for Cot in cell migration. We show that a specific increase of phospho-Erk1/Erk2 levels that can be triggered by Cot is required for cell migration, and that the induction of COX2 expression by overexpressing Cot-T can further enhance this capacity.

#### References

- [1] K. Sugimoto, M. Ohata, J. Miyoshi, H. Ishizaki, N. Tsuboi, A. Masuda, Y. Yoshikai, M. Takamoto, K. Sugane, S. Matsuo, Y. Shimada, T. Matsuguchi, *J. Clin. Invest.* 114 (2004) 857.
- [2] G.J. Van Acker, G. Perides, E.R. Weiss, S. Das, P.N. Tschlis, M.L. Steer, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 22140.
- [3] A. Banerjee, R. Gugasyan, M. McMahon, S. Gerondakis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 3274.
- [4] M. Caivano, C. Rodriguez, P. Cohen, S. Alemany, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 52124.
- [5] A.G. Eliopoulos, C.C. Wang, C.D. Dumitru, P.N. Tschlis, *Embo J.* 22 (2003) 3855.
- [6] C.D. Dumitru, J.D. Ceci, C. Tsatsanis, D. Kontoyiannis, K. Stamatakis, J.H. Lin, C. Patriotis, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, G. Kollias, P.N. Tschlis, *Cell* 103 (2000) 1071.
- [7] C. Rodriguez, M. Pozo, E. Nieto, M. Fernandez, S. Alemany, *Cell. Signal.* 18 (2006) 1376.
- [8] A. Salmeron, T.B. Ahmad, G.W. Carlile, D. Pappin, R.P. Narsimhan, S.C. Ley, *Embo J.* 15 (1996) 817.
- [9] A. Ballester, A. Velasco, R. Tobena, S. Alemany, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14099.
- [10] R. de Gregorio, M.A. Iniguez, M. Fresno, S. Alemany, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 27003.
- [11] M.P. Belich, A. Salmeron, L.H. Johnston, S.C. Ley, *Nature* 397 (1999) 363.
- [12] A. Velasco-Sampayo, S. Alemany, *J. Immunol.* 166 (2001) 6084.
- [13] A.G. Eliopoulos, C.D. Dumitru, C.C. Wang, J. Cho, P.N. Tschlis, *Embo J.* 21 (2002) 4831.
- [14] J. Miyoshi, T. Higashi, H. Mukai, T. Ohuchi, T. Kakunaga, *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 4088.
- [15] M.L. Gandara, P. Lopez, R. Hernando, J.G. Castano, S. Alemany, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 7377.
- [16] M. Chiariello, M.J. Marinissen, J.S. Gutkind, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 1747.
- [17] A.M. Chan, M. Chedid, E.S. McGovern, N.C. Popescu, T. Miki, S.A. Aaronson, *Oncogene* 8 (1993) 1329.
- [18] C. Patriotis, A. Makris, S.E. Bear, P.N. Tschlis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 2251.
- [19] K.M. Erny, J. Peli, J.F. Lambert, V. Muller, H. Diggelmann, *Oncogene* 13 (1996) 2015.
- [20] A.M. Clark, S.H. Reynolds, M. Anderson, J.S. Wiest, *Genes Chromosomes Cancer* 41 (2004) 99.
- [21] G. Sourvinos, C. Tsatsanis, D.A. Spandidos, *Oncogene* 18 (1999) 4968.
- [22] A.V. Christoforidou, H.A. Papadaki, A.N. Margioris, G.D. Eliopoulos, C. Tsatsanis, *Mol. Cancer* 3 (2004) 34.
- [23] A. Ballester, R. Tobena, C. Lisbona, V. Calvo, S. Alemany, *J. Immunol.* 159 (1997) 1613.
- [24] J.L. Jones, J.E. Royall, D.R. Critchley, R.A. Walker, *Exp. Cell Res.* 235 (1997) 325.
- [25] I. Palmero, M. Serrano, *Methods Enzymol.* 333 (2001) 247.
- [26] B. Fingleton, *Front. Biosci.* 11 (2006) 479.
- [27] M.R. Pan, M.F. Hou, H.C. Chang, W.C. Hung, *J. Biol. Chem.* (2008).
- [28] M. Tsujii, S. Kawano, S. Tsuji, H. Sawaoaka, M. Hori, R.N. DuBois, *Cell* 93 (1998) 705.
- [29] M.G. Backlund, J.R. Mann, R.N. Dubois, *Oncology* 69 (2005) 28 Suppl 1.
- [30] J.V. Small, B. Geiger, I. Kaverina, A. Bershadsky, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 957.
- [31] C.D. Nobes, A. Hall, *J. Cell Biol.* 144 (1999) 1235.
- [32] A.J. Ridley, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 2713.
- [33] C.M. Waterman-Storer, R.A. Worthylake, B.P. Liu, K. Burridge, E.D. Salmon, *Nat. Cell Biol.* 1 (1999) 45.
- [34] A.Y. Chan, S.J. Coniglio, Y.Y. Chuang, D. Michaelson, U.G. Knaus, M.R. Philips, M. Symons, *Oncogene* 24 (2005) 7821.
- [35] O.J. McCarty, M.K. Larson, J.M. Auger, N. Kalia, B.T. Atkinson, A.C. Pearce, S. Ruf, R.B. Henderson, V.L. Tybulewicz, L.M. Machesky, S.P. Watson, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 39474.
- [36] M.Y. Han, H. Kosako, T. Watanabe, S. Hattori, *Mol. Cell Biol.* 27 (2007) 8190.
- [37] W.T. Arthur, K. Burridge, *Mol. Biol. Cell.* 12 (2001) 2711.
- [38] A.G. Eliopoulos, C. Davies, S.S. Blake, P. Murray, S. Najafipour, P.N. Tschlis, L.S. Young, *J. Virol.* 76 (2002) 4567.
- [39] K.S. Chun, Y.J. Surh, *Biochem. Pharmacol.* 68 (2004) 1089.
- [40] A. Telliez, C. Furman, N. Pommery, J.P. Henichart, *Anticancer Agents Med. Chem.* 6 (2006) 187.
- [41] K.K. Wu, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 72 (2005) 89.